

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA NICOLAU MAIA

IDENTIFICAÇÃO DE *Botrytis* spp DO MORANGUEIRO NO ESTADO DO PARANÁ
E SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS

CURITIBA

2019

JULIANA NICOLAU MAIA

IDENTIFICAÇÃO DE *Botrytis* spp DO MORANGUEIRO NO ESTADO DO PARANÁ
E SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Agronomia, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Henrique da Silva Silveira Duarte

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Louise Larissa May De Mio

Coorientador: Dr. Wagner Vicente Pereira

CURITIBA

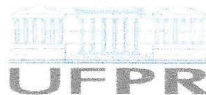
2019

Maia, Juliana Nicolau
Identificação de Botrytis spp do morangueiro no Estado do
M217i Paraná e sensibilidade a fungicidas / Juliana Nicolau Maia. -
Curitiba, 2019.
65 p.: il.,

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Setor
de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia
- (Produção Vegetal).
Orientador: Henrique Da Silva Silveira Duarte
Coorientadora: Louise Larissa May De Mio
Coorientador: Wagner Vicente Pereira

1. Morango - doenças e pragas - Paraná. 2. Fungicidas. I.
Duarte, Henrique Da Silva Silveira (Orientador). II. Mio, Louise
Larissa May De (Coorientadora). III. Pereira, Wagner Vicente
(Coorientador). IV. Título. V. Universidade Federal do Paraná.

CDU 634.75:615.282(816.2)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO AGRONOMIA
(PRODUÇÃO VEGETAL) - 40001016031P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de JULIANA NICOLAU MAIA intitulada: IDENTIFICAÇÃO DE *Botrytis* spp. DO MORANGUEIRO NO ESTADO DO PARANÁ E SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Fevereiro de 2019.

HENRIQUE DA SILVA SILVEIRA DUARTE
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

WAGNER VICENTE PEREIRA
Coorientador - Avaliador Externo (UFPR)

LOUISE LARISSA MAY-DE-MIO
Coorientador - Avaliador Interno (UFPR)

ALEXANDRE DINNYS ROESE
Avaliador Externo (EMBRAPA)

AGRADECIMENTOS

À minha família, minha mãe Soraya Nicolau Maia, meu pai João da Silva Maia e a irmã Gabriela por todo apoio. Aos meus cachorros Lilica e Kimi.

Ao meu orientador Prof. Dr. Henrique da Silva Silveira Duarte e aos coorientadores Prof^a. Dr^a. Louise Larissa May De Mio e Dr. Wagner Vicente Pereira pelos ensinamentos e críticas construtivas.

Aos amigos de laboratório, Jhulia, Camilla, Lívia, Marlon, Danielle, Heloisa, Eliane, Gabriel, Carlos, Mônica, Rafaele, Thiago, Meira, Renan, Pamela, Alexandre, Evandro e Dione.

Às estagiárias Érika e Giovana que foram indispensáveis durante a realização de todo o trabalho.

Aos técnicos de laboratório Izabel, Simone e Tiago, pela ajuda quando solicitada.

Aos professores da Pós-Graduação por sua dedicação ao ensino.

À secretária do PGAPV, Sra. Lucimara Antunes, pela disposição e dedicação.

Aos funcionários do departamento de Fitotecnia e Fitossanidade pelo auxílio.

Aos funcionários da Emater, em especial o Paulino, pela disponibilidade e auxílio nas coletas de campo em todo o estado.

Aos professores Sérgio Miguel Mazaro, da UTFPR Dois Vizinhos e Thiago de Oliveira Vargas, da UTFPR Pato Branco pela disponibilidade e ajuda nas coletas no sudoeste do estado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por conceder a bolsa de Mestrado.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram com a pesquisa e torceram por mim.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que
ninguém viu, mas pensar o que
ninguém ainda pensou sobre aquilo que
todo mundo vê.”*

Arthur Schopenhauer

RESUMO

O estado do Paraná é um dos maiores produtores brasileiros de morango, entretanto, um dos problemas que limita o cultivo de morango é a ocorrência de doenças em todos os estágios de desenvolvimento. Dentre essas doenças destaca-se o mofo cinzento causado por *Botrytis cinerea*. Esta espécie é a única relatada no Brasil em morango, entretanto por possuir alta variabilidade entre os isolados, novos estudos devem ser conduzidos para identificar as espécies que ocorrem no estado do Paraná. O controle químico é o método mais utilizado para o controle da doença. Não há estudos sobre sensibilidade de *B. cinerea* a fungicidas e sobre identificação de espécies de *Botrytis* que infectam morango no Paraná. Dessa forma há necessidade de identificação dos isolados a nível de espécie e avaliação da sensibilidade. Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram investigar as possíveis espécies causadoras de mofo cinzento no morango no Paraná e estudar sua sensibilidade aos fungicidas: procimidona (P), iprodiona (I), boscalida (B), tiofanato metílico (T), fluazinam (F), azoxistrobina (A) e difenoconazol (D). A identificação de 150 isolados de *Botrytis sp.* foi realizada por meio da amplificação do DNA por PCR, utilizando iniciadores específicos. A sensibilidade aos fungicidas foi determinada com ensaios in vitro por doses discriminatórias e CE₅₀ (concentração efetiva para inibir 50% do crescimento do fungo) e ex vivo (eficácia de controle da doença). Fenótipos foram determinados a partir de combinações (S- sensível e R- resistente) entre os fungicidas testados. Foram selecionados 30 isolados com base no fenótipo para estudo da CE₅₀ que foi estimada a partir da regressão linear entre a porcentagem de inibição do crescimento micelial e do respectivo log₁₀ das concentrações do fungicida. Para verificar o controle da doença, frutos tratados com os fungicidas (P), (B), (T), (F), (A), e (D) foram inoculados com dois isolados com diferentes fenótipos. Neste ensaio foram avaliados o período de incubação, período de latência, incidência final e área abaixo da curva de progresso da incidência(AACPD). Não foram identificadas novas espécies, todos os isolados foram confirmados como *Botrytis cinerea*. Foram identificados 41 fenótipos de sensibilidade a fungicidas e destes, seis apresentaram resistência aos sete fungicidas testados. A porcentagem de isolados resistentes foi de 45,3; 43,3; 44,0; 90,0; 32,7 e 33,3% para os fungicidas boscalida, iprodiona, procimidona, azoxistrobina, fluazinam e difenoconazol, respectivamente. A frequência de isolados altamente resistentes ao tiofanato metílico foi de 94,6%. A CE₅₀ para os fungicidas procimidona, fluazinam e boscalida variou de valores inferiores a 0,1 até superiores a 100 µg/ml. Para azoxistrobina a maioria dos isolados apresentou CE₅₀ superior a 100 µg/ml. Os ensaios ex vivo mostraram que o fluazinam é o fungicida que proporciona melhor controle.

Palavras-chave: Mofo cinzento; Controle Químico; Resistência a fungicidas

ABSTRACT

The state of Paraná is one of the largest Brazilian strawberry producers. However, the appearance of diseases at all stages of development limits strawberry cultivation. Among these diseases, the gray mold caused by *Botrytis cinerea* stands out. This species is the only one reported in Brazil in strawberry. However, because of the high variability among the isolates, new studies should be conducted to identify the species that occur in the state of Paraná. Chemical control is the most commonly used method for disease management. There are no studies on the sensitivity of *B. cinerea* to fungicides and on the identification of *Botrytis* species that infect strawberries in Paraná. Therefore, identification of isolates at the species level and sensitivity assessments should be performed. The objective of this work was to investigate the species causing gray mold in strawberry in Paraná and to study its sensitivity to fungicides: procymidone (P), iprodione (I), boscalid (B), thiophanate-methyl (T), fluazinam (F), azoxystrobin (A) and difenoconazole (D). The identification of 150 isolates of *Botrytis* sp. was performed by DNA amplification by PCR, using specific primers. Sensitivity to fungicides was determined *in vitro* by discriminatory doses and EC₅₀ (effective concentration to inhibit 50% fungus growth) and *ex vivo* (disease control efficacy). Phenotypes were determined from combinations (S-sensitive and R-resistant) among the fungicides tested. We selected 30 phenotype-based isolates for the EC₅₀ study that was estimated from the linear regression between the percentage inhibition of mycelial growth and the respective log₁₀ of fungicide concentrations. To verify the control of the disease, fruits treated with fungicides (P), (B), (T), (F), (A), and (D) were inoculated with two isolates with different phenotypes. In this trial, the incubation period, latency period, final incidence and area under the disease progress curve (AUDPC) were evaluated. No new species were identified, all isolates being confirmed as *Botrytis cinerea*. A total of 41 fungicide sensitivity phenotypes were identified and six were resistant to all seven fungicides tested. The percentage of resistant was 45.3; 43.3; 44.0; 90.0; 32.7 and 33.3% for the fungicides boscalide, iprodione, procymidone, azoxystrobin, fluzinam and difenoconazole, respectively. The frequency of highly resistant isolates to thiophanate-methyl was 94.6%. The EC₅₀ for the fungicides procymidone, fluazinam and boscalid ranged from values less than 0.1 to higher than 100 µg/ml. For azoxystrobin most of the isolates had EC₅₀ higher than 100 µg/ml. *Ex vivo* assays have shown that fluazinam is the fungicide that provides better control.

Keywords: Gray mold; Chemical Control; Resistance to fungicides

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 OBJETIVOS.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 O MORANGUEIRO.....	12
2.2 DOENÇAS DO MORANGUEIRO	13
2.2.1 Mofo cinzento.....	14
2.3 ESPÉCIES DE <i>Botrytis</i> RELACIONADAS COM O MOFO CINZENTO DO MORANGUEIRO.....	16
2.4 CONTROLE QUÍMICO	16
2.5 RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS.....	23
3.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS <i>DE Botrytis</i> spp.	24
3.2.1 Extração do DNA	24
3.2.2 Amplificação por PCR.....	25
3.3 ENSAIO DE SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS.....	25
3.3.1 Fungicidas.....	25
3.3.2 Discriminação da sensibilidade de <i>B. cinerea</i> por meio de dose discriminatória	26
3.3.3 Discriminação da sensibilidade de <i>B. cinerea</i> por meio da CE ₅₀	28
3.3.4 Avaliação da eficácia de fungicidas no controle do mofo-cinzento do morangueiro	30
4 RESULTADOS	33
4.1 IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIE.....	33
4.2 AVALIAÇÃO POR DOSE DISCRIMINATÓRIA.....	33
4.3 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO EFETIVA CAPAZ DE INIBIR 50% DO CRESCIMENTO MICELIAL OU DA GERMINAÇÃO DE ESPOROS (CE ₅₀) ..	35
4.4 AVALIAÇÃO DO ENSAIO COM FRUTOS.....	38
4.4.1 Eficácia em frutos com infecções vindas do campo	38

4.4.2 Eficiência em frutos inoculados em laboratório	39
5 DISCUSSÃO	42
6 CONCLUSÕES.....	47
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48
REFERÊNCIAS	49
APÊNDICE – Tabela completa de Fenótipos	60

1 INTRODUÇÃO

Dentre os cultivos de pequenas frutas, o morangueiro (*Fragaria X ananassa* Duch) destaca-se como importante gerador de renda e emprego para várias regiões do país, promovendo a diversificação de cultivos nas propriedades rurais (FACHINELLO et al., 2011). O Paraná é um dos principais estados produtores de morango no Brasil e o volume de produção encontra-se em constante ascensão em razão da expansão das áreas plantadas. Em 2016, este estado produziu aproximadamente 22.000 toneladas em 699 hectares (SEAB DERAL, 2016), sendo grande parte, 40% da produção do estado, concentrada na região metropolitana de Curitiba. No entanto, o morangueiro é suscetível à várias doenças, muitas delas de difícil controle. Este é um dos principais fatores limitantes para essa expansão, principalmente as doenças fúngicas e o reduzido número de produtos registrados para seu controle (HENZ et al., 2010).

O mofo cinzento e a antracnose são as principais doenças que limitam a produção de morangos no Brasil (BAGGIO et al., 2018). Ambas têm alto poder destrutivo podendo se espalhar rapidamente no campo, reduzindo o rendimento e tornando o fruto não comercializável (DEAN et al., 2012). *Botrytis cinerea* Pers., agente causal do mofo cinzento, possui uma vasta gama de hospedeiros, podendo infectar mais de 200 espécies de plantas (WILLIAMSON et al., 2007). Além disso, possui alta variabilidade, que pode ser observada nas características culturais, morfológicas e sensibilidade a fungicidas (FOURNIER et al., 2005). A variabilidade pode estar relacionada às mais de 30 espécies que compõe o gênero *Botrytis* (FILLINGER & ELAD, 2015). *Botrytis cinerea*, *B. fragariae* (RUPP et al., 2017), *B. caroliniana* (LI et al., 2012), *B. mali* (DOWLING & SCHNABEL, 2017) e *B. pseudocinerea* (PLESKEN et al., 2015) são capazes de infectar morangueiro em países como Alemanha e Estados Unidos. Contudo, somente *B. cinerea* tem sido identificada nas áreas de cultivo nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Espírito Santo no Brasil (LOPES et al., 2017).

A utilização de fungicidas tem sido a principal estratégia para o controle da doença no mundo (JANISIEWICZ et al., 2016; VITALE et al., 2016). Entretanto, o manejo inadequado, incluindo sucessivas aplicações de fungicidas de mesmo ingrediente ativo, propicia a seleção de indivíduos resistentes na população do

patógeno (GHINI & KIMATI, 2002). Além disso, *B. cinerea* tem alto risco de desenvolver resistência, por ter curto ciclo de vida e grande produção de esporos (BARDAS et al., 2010). Relatos na China apontaram a resistência de *B. cinerea* aos fungicidas procimidona, tiofanato metílico, pirimetanil, carbendazin, dietofencarb e iprodiona (CHEOL SOO et al., 2008; LIU et al., 2016). Em razão do aumento de indivíduos resistentes a fungicidas, os produtores têm utilizado misturas de fungicidas, com diferentes modos de ação para manejar a doença (RASHID et al., 2014). No Brasil, já foram realizados estudos sobre o comportamento de isolados de *B. cinerea* aos principais fungicidas registrados para a cultura. Isolados mostraram-se resistentes a iprodiona, azoxistrobina e tiofanato metílico (BAGGIO et al., 2018; LOPES et al., 2017). Com base nas informações levantadas pelos produtores paranaenses quanto a baixa eficácia dos fungicidas, acredita-se que também existam isolados resistentes a fungicidas no Paraná, onde não foram realizados ainda estudos para identificação de espécies de *Botrytis* em morangueiro, e nem sobre a sensibilidade de isolados de *B. cinerea*, aos principais fungicidas registrados para a cultura.

1.1 OBJETIVOS

- Investigar as possíveis espécies de *Botrytis* que causam o mofo cinzento nas diferentes regiões produtoras de morango do Paraná.

- Estudar a sensibilidade de isolados de *B. cinerea* aos fungicidas iprodiona, procimidona, tiofanato metílico, fluazinam, boscalida, difenoconazol e azoxistrobina, utilizados no manejo do mofo cinzento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O MORANGUEIRO

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch) é uma das frutíferas mais importantes no mundo. Morangos são produzidos em mais de 70 países e apresentam características sensoriais e gustativas bastante atrativas (WILBOIS et al., 2012; GIMENEZ et al., 2008).

A China e os Estados Unidos são os maiores produtores de morango do mundo, com produção aproximada de 3,8 e 1,4 milhões de toneladas, respectivamente. O Brasil, a Argentina e o Chile são os maiores produtores na América do Sul e produzem conjuntamente 318 mil toneladas do fruto (FAOSTAT, 2019). Pouco se sabe sobre a produção total de morango no Brasil. No Estado do Paraná foram produzidas 22.000 toneladas do fruto em 2016 (SEAB DERAL, 2016). Cerca de 40% da produção paranaense está concentrada na região metropolitana de Curitiba. A produção do estado está em expansão e a área plantada em 2016 foi de 699 hectares (SEAB DERAL, 2016).

A popularidade do morango se deve, dentre outros, aos esforços dos melhoristas que, desde o século XIX, têm desenvolvido cultivares adaptadas às mais diversas condições ambientais (HANCOCK et al., 1996). A produção nacional de morango demanda cerca de 175 milhões de mudas anualmente, sendo 15% importados do Chile e Argentina, 65% produzido por viveiristas locais e 20% pelo próprio produtor (PERES et al., 2013).

Um dos fatores que determina o sucesso do cultivo de morango é a escolha da cultivar. Algumas variáveis como a duração do ciclo, a produtividade, a qualidade da fruta, a resistência a pragas e doenças, e a distribuição da produção durante o ciclo de cultivo são aspectos determinantes para a escolha da variedade (COCCO et al., 2010).

As cultivares de morango podem ser classificadas em três grupos quanto à sensibilidade ao fotoperíodo: de dia longo (DL), de dia curto (DC) e dia neutro (DN). Os DC precisam de períodos luminosos diários menores que o período de escuridão

para induzir a floração, já os de 'dia longo' precisam de um longo fotoperíodo para indução floral e as cultivares de 'dia neutro' tem comportamento indiferente ao fotoperíodo, sendo mais sensível à temperatura. As cultivares utilizadas comercialmente são as de dia curto e neutro (COSTA et al., 2011).

A cultura demanda intensa mão-de-obra, que na maioria das vezes é familiar, contribuindo para a geração de renda e melhoria da qualidade de vida (OLIVEIRA et al., 2008). A produção de morangueiro tem passado por diferentes fases tecnológicas. No início o cultivo era convencional e mais tarde houve adesão de novos sistemas de produção, que incluíram uso de plásticos e coberturas para proteger a cultura e aumentar a qualidade do produto. A cobertura plástica pode ser utilizada em túneis baixos, altos e estufas (PORTELA et al., 2012).

O sistema de cultivo do morangueiro tem evoluído no decorrer dos anos, em função das exigências do consumidor e da necessidade do produtor. Observa-se no campo pelo menos três sistemas diferenciados de produção de morango: o sistema convencional, o sistema de produção integrado (PIMo) e o sistema orgânico (MADAIL et al., 2007). No sistema convencional de cultivo, as plantas podem receber alta quantidade de pulverizações durante o ciclo, utilizam-se insumos químicos tanto para fertilização como para controle fitossanitário (CAMARGO et al., 2010). No PIMo a estratégia tem um enfoque ecológico com o objetivo de diminuir significativamente ou eliminar o uso de pesticidas (CARROL et al., 2015) e no sistema orgânico, se utiliza a eficiência dos recursos naturais (CARVALHO et al., 2005). As doenças do morangueiro impactam o desempenho agrônômico da planta e geram perdas nos campos de produção de morango (KOIKE et al., 2010).

2.2 DOENÇAS DO MORANGUEIRO

Assim como outras plantas olerícolas, o morangueiro é suscetível a doenças, algumas delas de difícil diagnóstico e controle, que podem causar importantes danos em um ciclo de produção relativamente curto (HENZ et al., 2010). Estas doenças representam sérios problemas na cultura do morangueiro, podendo causar danos durante toda a produção do fruto (BAGGIO et al., 2018). Diferentes agentes causais são capazes de infectar o morangueiro. Dentre estes, os fungos causam a maior parte

das doenças conhecidas na cultura. Os sintomas decorrentes de infecção fúngica podem ocorrer em folhas, pecíolos, estolões, flores, frutos e raízes (DOMINGUES et al., 2001). Essas doenças diminuem a produtividade e aumentam os custos de produção, principalmente devido a necessidade de aplicação de fungicidas para o controle das doenças.

O mofo cinzento, causado por *Botrytis cinerea*, é uma das doenças mais importantes e pode causar grandes danos na pré e pós-colheita, devido a infecções de flores e frutos (DEAN et al., 2012; BAGGIO et al., 2018). Este patógeno está distribuído em todo o mundo e seu controle tem demandado intensiva aplicação de fungicidas durante a floração e frutificação (MERTELY et al., 2009).

2.2.1 Mofo cinzento

Botrytis cinerea Pers. Fr. (Teliomorfo *Botryotinia fuckeliana*) é o agente causal do mofo cinzento. Pertence ao filo Ascomycota, ordem Helotiales e família Sclerotiniaceae (WILLIAMSON et al., 2007). É um fungo necrotrófico, capaz de causar prejuízo em mais de 200 espécies de plantas em todo o mundo (LEGARD et al., 2000).

O mofo cinzento pode ocasionar grandes danos em pré e pós colheita. A infecção do patógeno no morangueiro se inicia na floração (BRISTOW et al., 1986). Conídios provenientes de escleródios germinados e restos culturais são as principais fontes de inóculo da doença. O patógeno pode sobreviver e esporular por vários meses em folhas de morangueiro mortas, além de estruturas florais incluindo estames e pétalas (BRAUN et al., 1987). O fungo pode ser disseminado entre campos de produção por meio de mudas (SUTTON et al., 1998). As flores recém-abertas são mais vulneráveis a infecção do patógeno, principalmente o receptáculo floral. Temperaturas de 15 a 25°C com longos períodos de umidade favorecem o desenvolvimento da doença (WILLCOX & SEEN et al., 1994).

A dispersão de conídios para as flores é realizada principalmente pela ação do vento e água. Além disso, podem ser disseminados por meio de operações de colheita (SUTTON et al., 1998). Após a penetração, dependendo do estágio de desenvolvimento do tecido, o patógeno pode permanecer quiescente. Dessa forma, muitas vezes, durante a colheita os frutos estão aparentemente sadios e a podridão pode se desenvolver após a colheita. Frutos em estágios mais avançados de

maturação propiciam intensa colonização do patógeno nos tecidos, o que culmina com sua esporulação na superfície do tecido. Essa esporulação pode fornecer inóculo para infecções secundárias (BRISTOW et al., 1986), caracterizando a doença como policíclica.

A sintomatologia mais comum da doença é o aparecimento de lesão de cor marrom nos frutos, seguida de uma massa cinzenta constituída pelos conídios e conidióforos do patógeno (WILLIAMSON et al., 2007).

Os escleródios desenvolvidos no tecido do hospedeiro são importante fonte de sobrevivência do fungo. São de tamanho variável e muitas vezes não são visíveis em todo o campo. Possuem uma proteção melanizada que envolve o micélio por longos períodos. Restos culturais infectados também podem favorecer a sobrevivência do patógeno por longos períodos (COLE et al., 1996).

Os danos pós-colheita causados por *B. cinerea* são importantes, uma vez que o patógeno pode permanecer inativo durante um longo período até a fruto amadurecer. Essa característica é um dos fatores limitantes na comercialização de morangos (VIRET et al., 2004).

Como o fungo é favorecido por alta umidade, pouca luz e temperatura moderada, é importante criar um dossel aberto com boa luminosidade para que as gotas de chuva sequem rapidamente. O uso de plásticos em túneis tem diminuído a doença em até 90% quando comparadas com campo aberto, apesar da ventilação ter um papel importante na redução da umidade relativa (XIAO et al., 2001).

Medidas culturais como a remoção de restos culturais, espaçamento adequado, irrigação sem excessos e uso de mudas saudáveis são importantes no manejo da cultura (OLIVEIRA et al., 2017; BERRIE et al., 2002; MERTELY et al., 2000).

O desenvolvimento de cultivares com resistência para *B. cinerea* tem sido difícil e não compensador (WILLIAMSOM et al., 2007). Embora não existam cultivares totalmente resistentes, existem diferenças significativas na suscetibilidade entre algumas cultivares, por exemplo, a cultivar Camarosa é menos suscetível que a cultivar Sweet Charlie (LEGARD et al., 2000). Alguns produtos biológicos como *Trichoderma harzianum*, *Clonostachys rosea* e *Ulocladium oudemansii*, a levedura *Candida oleophila*, ou bactérias, incluindo *Streptomyces griseoviridis*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas syringae* são utilizados para manejar a doença (KOVACH et al.,

2000). Entretanto, o controle químico tem sido o mais eficiente para manejar o mofo cinzento.

2.3 ESPÉCIES DE *Botrytis* RELACIONADAS COM O MOFO CINZENTO DO MORANGUEIRO

O gênero *Botrytis* tem mais de 30 espécies fitopatogênicas (FILLINGER & ELAD, 2015). Dentre essas, *B. cinerea*, *B. fragariae* (RUPP et al., 2017), *B. caroliniana* (LI et al., 2012), *B. mali* (DOWLING & SCHNABEL, 2017), *B. pseudocinerea* (PLESKEN et al., 2015) são capazes de infectar o morangueiro. Além de *Botrytis spp.*, *Amphobotrys ricini* também foi relatado causando mofo cinzento em morango na Flórida (AMIRI et al., 2016). Além das diferenças morfológicas, parece existir distinções no que diz respeito à sensibilidade aos fungicidas entre espécies (HU et al., 2017). *Botrytis fragariae* foi relatado pela primeira vez em fazendas comerciais na Carolina do sul, Estados Unidos. A espécie também foi encontrada em quatro estados da Alemanha (RUPP et al., 2017). Apesar de ser encontrado também em frutos, Dowling & Schanabel, 2017 perceberam que *B. fragariae* tem preferência por flores Já *B. cinerea* não apresenta preferência por tecido, além disso, isolados de *B. cinerea* apresentam diferenças morfológicas em meio de cultura e na sensibilidade a fungicidas. Na Carolina do Sul e do Norte, Estados Unidos, estudos morfológicos e moleculares indicaram a presença de uma outra espécie, *Botrytis caroliniana*, causando mofo cinzento em amora (LI et al., 2012). Esta espécie foi relatada em frutos de morangueiro, cujo sintomas são semelhantes ao mofo cinzento causado por *B. cinerea* (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2012). Entretanto, apenas *B. cinerea* foi identificada nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo (LOPES et al., 2017).

2.4 CONTROLE QUÍMICO

O controle químico tem sido a principal estratégia utilizada no controle das doenças do morangueiro, sendo usados fungicidas de diferentes grupos químicos como Metil-benzimidazol-Carbamato, dicarboxamida, carboxamidas e

anilinopirimidinas (ZHAO et al., 2010). Os fungicidas, aplicados de maneira preventiva, desempenham papel importante no controle do mofo cinzento em razão de sua eficácia, prevenindo o apodrecimento em pré e pós colheita (FERNANDEZ-ORTUNÕ et al., 2015; AMIRI et al., 2013).

Os fungicidas podem ser classificados pelo modo de ação, sítio alvo, grupo químico e nome comum. A Classificação dos fungicidas registrados para o morangueiro no Brasil está listada na TABELA 1.

TABELA 1. CLASSIFICAÇÃO FRAC (Comitê de ação a resistência a fungicidas) DE FUNGICIDAS REGISTRADOS PARA O MORANGUEIRO NO BRASIL.

Modo de Ação	Sítio alvo	Nome do grupo	Nome Comum
B: citoesqueleto e proteínas motoras	B1: Montagem de β -tubulina na mitose	MBC- (Metil Benzimidazol Carbamatos)	Tiofanato Metílico
C: respiração	C3: citocromo bc1 (oxidase de ubiquinol) no local da Qo (gene cyt b)	IQE- (inibidores da quinona externa)	Azoxistrobina
E: Transdução de sinal	E3: MAP/histidina-quinase na transdução de sinal osmótico (os-1, Daf1)	Dicarboxamidas	Iprodiona e procimidona
G: Biossíntese de esterol nas membranas	G1:C14-desmetilase na biossíntese de esteróis erg11 / cyp51	IDM- (Inibidores da desmetilação)	Difenoconazol, tebuconazol e metconazol
C: respiração	C2: succinato-desidrogenase	SDHI- (Inibidores da succinato desidrogenase)	Boscalida

C: respiração	C5: desacopladores de fosforilação oxidativa	—	Fluazinam
---------------	---	---	-----------

FONTE: FRAC, 2018.

Os produtos registrados para a cultura do morangueiro no Brasil (TABELA 2) compreendem inibidores de quinona externa (IQEs), dicarboximadas (DCs), inibidores de desmetilação (IDMs), anilina-pirimidinas (APs), carbamatos de metil-benzimidazole (MBCs) e carboxamidas (ISDHs) (ADAPAR, 2018).

TABELA 2. FUNGICIDAS REGISTRADOS PARA A CULTURA DO MORANGUEIRO NO BRASIL.
(CONTINUA)

Ingrediente Ativo	Nome Comercial	Empresa Registrante
Fluazinam	Agata*	Isk Biosciences Brasil Defen. Agrícolas Ltda
	Altima*	Isk Biosciences Brasil Defen. Agrícolas Ltda
	Approve(+Tiofanato)* **	Iharabras S.A. Industrias Químicas
	Cignus*	Isk Biosciences Brasil Defen. Agrícolas Ltda
	Frowncide 500 SC*	Isk Biosciences Brasil Defen. Agrícolas Ltda
	Legacy*	Isk Biosciences Brasil Defen. Agrícolas Ltda
	Organ 500 SC*	Rotam Do Brl Agroq. Produtos Agrícolas Ltda
Azoxistrobina	Amistar Top (+ Difenoco)*	Syngenta Proteção De Cultivos Ltda
	Amistar WG*	Syngenta Proteção De Cultivos Ltda
	Avura(+Difenoconazol)* **	Plurie Soluções Regulatórias
	Vantigo*	Syngenta Proteção De Cultivos Ltda
Difenoconazol	Curygen EC*	Avgust Crop Protection Importação E Exportação Ltda
	Difcor 250 EC*	Cross Link Consultoria E Comércio Ltda
	Prisma Plus*	Helm Do Brasil Mercantil Ltda
	Score*	Syngenta Proteção De Cultivos Ltda
	Volna 250 EC*	Avgust Crop Protection Importação E Exportação Ltda
Imibenconazol	Menage 150* **	Arysta Lifescience Do Br Industria Química S.A
Metconazol	Caramba 90*	Basf S.A

TABELA 2. FUNGICIDAS REGISTRADOS PARA A CULTURA DO MORANGUEIRO NO BRASIL. (CONCLUSÃO)

Tebuconazol	AUG 137* **	Avgust Crop Protection Importação E Exportação Ltda
	Constant* **	Bayer S.A
	Elite* **	Bayer S.A
	Folicur 200 EC*	Basf S.A
	Keysol EC* **	Avgust Crop Protection Importação E Exportação Ltda
	Lost* **	Prentiss Química Ltda
	Nativo(+Trifloxistrobina)*	Basf S.A
	Certus(+Pirimetanil)**	Bayer S.A
Iprodiona	Ipro 500 SC**	Tradecorp Do Br Comércio De Insumos Agrícolas Ltda
	Magic	Tradecorp Do Br Comércio De Insumos Agrícolas Ltda
	Rovral	Fmc Química Do Brasil Ltda
	Rovral SC	Fmc Química Do Brasil Ltda
Procimidona	Sialex 500	Sumitomo Chemical Do Brasil Ltda
	Sumiguard 500 WP	Sumitomo Chemical Do Brasil Ltda
	Sumilex 500 WP	Sumitomo Chemical Do Brasil Ltda
Boscalida	Cantus	Basf S.A
	Collis(+Crosoxim-Metílico)	Basf S.A
Pirimetanil	Mythos	Basf S.A
Tiofanato Metílico	Cercobin 700 WP	Iharabras S.A. Industrias Químicas
	Metiltiofan	Sipcam Nichino Brasil S.A.
	Mofotil* **	Helm Do Brasil Mercantil Ltda
	Pilartime* **	Pilarquim Br Comercial Ltda
	Topsin 700	Iharabras S.A. Industrias Químicas

*Fungicidas Registrados Apenas Para A Cultura e Não Para *Botrytis* **Não Registrado No Paraná.

FONTE: AGROFIT, 2018

No Brasil, sob condições climáticas favoráveis, várias aplicações podem ser necessárias durante o ano de cultivo (COSTA et al., 2014). Apesar do controle químico ser uma estratégia importante para controle do mofo cinzento, a seleção de populações de fungos insensíveis aos fungicidas tem sido grande adversidade para produtores de morango no mundo (BRENT & HOLLOMON, 2007).

2.5 RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS

A pulverização intensiva com fungicidas para a produção de morangos tem selecionado isolados de *B. cinerea* resistentes a fungicidas e, consequente, tem reduzido o controle do mofo cinzento (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2016; ISHII et al., 2009; RUPP et al., 2017). A resistência de *B. cinerea* aos fungicidas dicarboxamidas e Metil-Benzimidazol-Carbamato (MBC) é mais comumente relatada. Entretanto, estudo realizado na Espanha indicou a redução da sensibilidade do patógeno aos fungicidas piraclostrobina, boscalida, ciprodinil, fenhexamida, iprodiona e fludioxonil (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2014).

Coletas realizadas em diversas localidades na China indicaram resistência múltipla. Mais de 66% dos isolados foram classificados com fenótipo resistente a quatro fungicidas: carbendazim, dietofencarb, procimidona e pirimetanil (LIU et al., 2016).

Vários mecanismos através dos quais *B. cinerea* torna-se menos sensíveis a fungicidas foram identificados, sendo mais comumente relatadas as mutações nos sítios-alvo dos fungicidas (BAGGIO et al., 2018; LOPES et al., 2017; LEROUX et al., 2002). Aplicações frequentes de fungicidas aumentam o risco de seleção para a resistência no patógeno, especialmente para *B. cinerea* que tem um alto risco de resistência a fungicidas (LEROUX et al., 2002).

Os fungicidas MBC, utilizados no manejo de *B. cinerea* estão incluídos na lista de alto risco para resistência (FRAC, 2017). O Benomyl, lançado na década de 1960, proporcionava ótimo controle da doença, entretanto, em 1977 começaram a ser identificados isolados resistentes ao fungicida (DEKKER et al., 1977). Atualmente o fungicida tem pouca eficácia no controle do mofo cinzento. A resistência aos fungicidas MBC é conferida como resultado de mutações pontuais no gene da beta-tubulina. As substituições mais frequentes em *B. cinerea* resistentes ocorrem nos códons 198 e 200 do gene da beta-tubulina (MA & MICHAILIDES, 2005).

Os fungicidas inibidores de quinona externa (IQE) agem inibindo a produção de ATP durante o processo de respiração mitocondrial por bloquearem a transferência de elétrons do citocromo b e citocromo c1 (BARTLETT et al., 2002). O alto risco desses fungicidas selecionarem indivíduos resistentes já foi relatado para vários patógenos, inclusive para *B. cinerea* (AMIRI et al., 2013). Azoxistrobina foi introduzida como um típico fungicida IQE para o controle do mofo cinzento nos últimos anos, em vários países. Três substituições de aminoácidos (G143A, F129L e G317R) no gene *cyt b* estão relacionados com a resistência a IQEs (FERNANDEZ-ORTUNO et al.,

2015). Na maior parte dos casos, a mutação em G143A causa um alto nível de resistência a IQEs em isolados de *B. cinerea* de campo, enquanto as demais mutações conferem níveis intermediários de resistência (LEROCH et al., 2013).

Os fungicidas dicarboxamidas, que bloqueiam a histidina-quinase na via de transdução de sinal, foram introduzidos no mercado para superar a resistência a MBC. Isolados de campo de *B. cinerea* resistente à iprodiona, um dos fungicidas dicarboximida, já foram encontrados na China, EUA, Espanha, Brasil e outros países (SUN et al., 2010; YIN et al., 2014; GRABKE, et al., 2014; BAGGIO et al., 2018). Várias mutações pontuais no gene *bos1* da histidina quinase conferem resistência à dicarboxamida (MA et al., 2007; OSHIMA et al., 2006). Os isolados de *B. cinerea* podem apresentar níveis baixos, médios ou altos de resistência aos fungicidas de dicarboximida. Os níveis baixos a médios são comumente encontrados em isolados de campo, enquanto que altos níveis de resistência são incomuns no campo (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2016).

A ação antifúngica dos IDM baseia-se na inibição da desmetilação de agentes dependentes do citocromo P450 de lanosterol na síntese de ergosterol, o principal esterol da membrana fúngica (STEHMANN & WAARD, 1995). A resistência de campo a estes fungicidas acontece de forma relativamente lenta em comparação com outros fungicidas mais específicos (WAARD et al., 1990).

Os inibidores da succinato desidrogenase (ISDHs) têm um modo de ação de sítio único, inibindo a atividade do complexo respiratório mitocondrial II, que está ligado à transferência de elétrons mitocondriais na via da respiração (RUPRECHT et al., 2009). Assim como a maioria dos fungicidas que possuem um único modo de ação e uso excessivo, os ISDHs são considerados de médio a alto risco para desenvolvimento de resistência (FRAC, 2017). A resistência à “nova geração” de ISDHs, principalmente boscalida, foi encontrada posteriormente ao seu registro em isolados de campo dos mais variados patógenos (AMIRI et al., 2014; AVENOT et al., 2008; ISHII et al., 2011; STAMMLER et al., 2014; VILLANI et al., 2016; VITALE et al., 2016; YANG et al., 2015). O modo de ação específico possibilita que o fungo desenvolva resistência com facilidade, necessitando de poucas alterações. Em geral, mutações que afetam o segundo e o terceiro complexos nas posições de aminoácidos 225, 230 e 272 conferindo diferentes níveis de resistência a estes fungicidas (DE MICCOLIS et al., 2012; LEROUX et al., 2010; STAMMLER et al., 2008).

Fluazinam, é um fungicida que se baseia no desacoplamento da fosforilação oxidativa em patógenos fúngicos (GUO et al., 1991). A resistência de campo de *B. cinerea* ao fluazinam foi relatada somente no Japão (TAMURA, 2000). Seu mecanismo de resistência é semelhante ao das dicarboxamidas (KANETIS et al., 2008). Evidência disso é o comportamento dos isolados em relação ao estresse osmótico, em que os isolados resistentes ao fluazinam reduziram a aptidão e podem não sobreviver no campo, se mostrando altamente sensíveis ao estresse osmótico. (SHAO et al., 2015). O fluazinam é considerado de baixo risco de resistência (MUELLER et al., 2008). Com isso o fungicida ainda vem exibindo eficiente atividade contra *B. cinerea* in vitro e em condições controladas (SHAO et al., 2015).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS

Os isolados de *Botrytis* spp. foram coletados em 89 campos comerciais de morango nas principais regiões produtoras do estado do Paraná (TABELA 3). Dos 150 isolados obtidos, 146 foram coletados de produção convencional e 4 de produção orgânica. Todos os isolados foram provenientes de frutos sintomáticos.

TABELA 3 – ORIGEM DOS ISOLADOS DE *Botrytis* spp. PROVENIENTES DE CAMPOS DE MORANGO DO ESTADO DO PARANÁ.

Região Produtora	Município	Número de Isolados
Curitiba e Região metropolitana	Araucária	13
	Curitiba	1
	Lapa	1
	*São José dos Pinhais	69
Norte Pioneiro	Conselheiro Mairinck	8
	Jaboti	16
	Japira	11
	Pinhalão	11
Sudeste	Mallet	3
	Prudentópolis	1
	Rio Azul	10
Sudoeste	Dois Vizinhos	1
	Francisco Beltrão	1
	Pato Branco	3
	**Verê - PR	1

*Três isolados provenientes de produção orgânica. ** Isolado proveniente de produção orgânica.

Os isolados de *Botrytis* spp. foram obtidos por meio do isolamento indireto. Parte do tecido infectado do interior do fruto foi transferido para o meio batata-dextrose-água (BDA) à 25°C com fotoperíodo de 12h durante sete dias. Repiques

sucessivos foram conduzidos até a obtenção de colônias puras. Os repiques foram realizados utilizando a ponta de hifa para diminuir a variabilidade genética.

Para não perderem suas características após sucessivos repiques, todos os isolados foram armazenados em quatro meios: em água (método Castellani) armazenado em temperatura ambiente, em sílica-gel utilizando discos de papel filtro, armazenado a -20°C e Armazenamento por congelamento de duas maneiras: glicerol armazenado a -80°C e tiras de papel-filtro a -20°C. A coleção dos isolados foi depositada no Laboratório de Epidemiologia para Manejo integrado de doenças (LEMID) da Universidade Federal do Paraná.

3.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS *DE Botrytis* spp.

Todos os 150 isolados coletados nas diferentes regiões produtoras do Paraná foram identificados molecularmente.

3.2.1 Extração do DNA

O DNA de cada isolado foi extraído utilizando o protocolo CTAB, com algumas modificações (DOYLE & DOYLE, 1987; PEREIRA et al., 2019). Para cada isolado, uma porção micelial, oriunda de colônia cultivada durante sete dias, foi depositada dentro de microtubos contendo 800 µL de CTAB. Os microtubos após agitação foram armazenados em banho-maria à 65°C durante 30 minutos, agitando-os a cada 15 minutos. Foram então centrifugados a 3000 rpm durante 5 minutos e 400 µL do sobrenadante de cada amostra foi adicionado dentro de novos microtubos juntamente com 400 µL de álcool isoamílico/clorofórmio na proporção 24/1. Esses microtubos foram agitados e centrifugados a 13500 rpm durante seis minutos. A fase superior do sobrenadante foi coletada e adicionada em microtubos contendo 120µL de isopropanol. Após agitação os microtubos permaneceram a -20°C durante 30 minutos. Após este período, os microtubos foram centrifugados a 13500 rpm durante 22 minutos. Todo o sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi homogeneizado com 1mL de etanol 70%. Os microtubos foram agitados a 13500 rpm durante 12 minutos. Posteriormente, todo o sobrenadante foi descartado e o pellet

formado permaneceu em temperatura ambiente até sua total desidratação. O Pellet foi ressuspenso em água ultrapura e armazenados a -20°C.

3.2.2 Amplificação por PCR

A identificação das espécies foi realizada por meio da PCR, utilizando os iniciadores diretos G3PDH-F1 e G3PDH-F2 em conjunto com o reverso G3PD-R para identificação de *B. caroliniana* e *B. cinerea*, respectivamente (LI et al., 2012). A reação foi conduzida em um volume total de reação de 12,5 µL, constituída de 6,25 do PCR Master Mix 2x (Promega), 10 µM de cada iniciador e 1,5 µL de DNA. A amplificação foi constituída de uma desnaturação inicial a 94°C por 3 min seguida de 32 ciclos a 94 °C por 30 s, 56 °C por 30 s e 72 °C por 1 min e uma extensão final a 72 °C durante 5 min. O produto da PCR foi analisado em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5X, corado com gelRed (Biotium) e fotodocumentado em transluminador ultravioleta.

3.3 ENSAIO DE SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS

3.3.1 Fungicidas

A sensibilidade de *B. cinerea* aos fungicidas azoxistrobina (Amistar 500 WG, Syngenta Proteção de cultivos), iprodiona (Rovral® SC, Basf Agri Production SA), tiofanato metílico (Cercobin 700 WP, Ihara), procimidona (Sumilex 500 WP, Sumitomo), boscalida (Cantus®, Basf Agri Production SA), fluazinam (Frownicide® 500 SC, ISK) e difenoconazol (Score 250 EC®, Syngenta Proteção de cultivos) foi avaliada. A escolha dos fungicidas foi baseada na frequência de fungicidas mais utilizados no estado do Paraná para o controle do mofo cinzento (TABELA 4). As soluções estoque dos fungicidas foram preparadas com água destilada esterilizada. A sensibilidade aos fungicidas foi avaliada por meio de dose discriminatória, determinação da concentração efetiva para inibir 50% do crescimento do fungo (CE₅₀) e a eficiência dos fungicidas na proteção dos frutos contra o mofo cinzento.

TABELA 4 - FREQUÊNCIA DE FUNGICIDAS MAIS UTILIZADOS NAS PROPRIEDADES PRODUTORAS DE MORANGO NO ESTADO DO PARANÁ.

Fungicida	Ingrediente ativo	Propriedades (%)
Sumilex ou Sialex	Procimidona	76,7
Rovral	Iprodiona	30
Frowncide 500 SC	Fluazinam	14
Cerbobin 700	Tiofanato Metílico	15,3
Amistar	Azoxistrobina	3,3
Cantus	Boscalida	1,3
Score	Difenoconazol	2

3.3.2 Discriminação da sensibilidade de *B. cinerea* por meio de dose discriminatória

3.3.2.1 Avaliação por crescimento micelial

A sensibilidade dos 150 isolados de *B. cinerea* aos fungicidas iprodiona, procimidona, tiofanato metílico e difenoconazol foi determinada por meio do crescimento micelial. As doses utilizadas para discriminação da sensibilidade dos isolados foram: I) 5 µg/ml para iprodiona, procimidona e tiofanato metílico, II) 10 µg/ml para difenoconazol e III) 500 µg/ml para tiofanato metílico. Os fungicidas comerciais foram diluídos com água destilada esterilizada afim de se obter as soluções estoques para, posteriormente, serem adicionadas ao meio batata-dextrose-ágar (BDA) autoclavado e mantidos a 60°C. O meio foi adicionado em placas de Petri de 90 mm e discos de micélio de 5 mm de diâmetro, obtidos de colônias com sete dias de cultivo, foram depositados na superfície do meio de cultura. O tratamento testemunha consistiu apenas dos discos de micélio dos isolados sobre o meio BDA sem fungicida. Foram utilizadas 3 placas por isolado/dose discriminatória. As placas foram incubadas a 25°C com fotoperíodo de 12 horas diárias por dois dias. O diâmetro da colônia foi obtido por meio da média de duas medidas perpendiculares da colônia com o auxílio de um paquímetro digital. A porcentagem de inibição do crescimento micelial foi calculada usando a fórmula $\%ICM = [(C-T)/C] \times 100$, onde C se refere ao diâmetro da

testemunha e T ao diâmetro médio do tratamento com fungicida. Classificação dos isolados quanto ao fenótipo foi realizada de acordo com a TABELA 5.

3.3.2.2 Avaliação por germinação de esporos

A sensibilidade dos 150 isolados de *B. cinerea* aos fungicidas fluazinam, azoxistrobina e boscalida foi determinada por meio da germinação de esporos. As doses utilizadas para discriminação da sensibilidade dos isolados foram: I) 1 µg/ml para fluazinam, II) 10 µg/ml para azoxistrobina e III) 50 µg/ml para boscalida. Os fungicidas comerciais foram diluídos com água destilada esterilizada a fim de se obter as soluções estoques. No tratamento com azoxistrobina foi adicionado ácido salicilhidroxâmico (SHAM). O SHAM foi dissolvido em metanol 100% para obter 100 µg/ml. As soluções estoques foram adicionadas no meio ágar-água (AA) autoclavado e mantidos a 60°C até obtenção das doses discriminatórias. Então o meio com fungicida foi adicionado em placas de Petri de 90 mm de diâmetro. Discos de micélio de 5 mm de diâmetro dos isolados foram transferidos para pêssego em conserva para produção de inóculo. A esporulação na superfície dos frutos em conserva foi utilizada para produção das suspensões de esporos. Alíquotas de 200 µl da suspensão contendo 10^5 conídios/ml de cada isolado foi adicionada na superfície dos meios de culturas e as placas foram incubadas a 25°C durante 12 a 14 h no escuro. Após esse período a germinação foi paralisada adicionando lactofenol com corante azul de Amann nas placas. As placas foram divididas em quadrantes equidistantes e a germinação dos conídios foi estimada em cada quadrante. Cem conídios por quadrante foram avaliados. Os conídios foram considerados germinados quando produziram tubos germinativos com pelo menos o dobro de seu tamanho. Cada tratamento consistiu de três repetições. A relação de inibição da germinação de conídios foi calculada usando a fórmula $\%IGC = [(C-T)-C] \times 100$ onde C é o número de conídios germinados na testemunha e T o número dos conídios germinados no tratamento. Classificação dos isolados foi feita de acordo com a TABELA 5.

TABELA 5 - INFORMAÇÕES SOBRE OS FUNGICIDAS E METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA AVALIAR A SENSIBILIDADE DE *Botrytis cinerea* UTILIZANDO DOSES DISCRIMINATÓRIAS.

INGREDIENTE ATIVO	DOSE DISCRIMINATÓRIA	CLASSIFICAÇÃO
Azoxistrobina	10 µg/ml	R- IGC<80%
Boscalida	10 µg/ml	R- IGC<80%
Difenoconazol	10 µg/ml	R- ICM< 80%
Fluazinam	1 µg/ml	R- IGC<50%
Iprodiona	5 µg/ml	R- ICM< 80%
Procimidona	5 µg/ml	R- ICM< 80%
Tiofanato Metílico	5 e 500 µg/ml	R se cresceu em 5µg/ml HR se cresceu em 500µg/ml

R- resistente HR- altamente resistente ICM - Inibição do crescimento micelial IGC- Inibição da germinação de conídios

3.3.3 Discriminação da sensibilidade de *B. cinerea* por meio da CE₅₀

Neste experimento foi utilizada uma subpopulação contendo 30 isolados com diferentes padrões de sensibilidade aos fungicidas procimidona, fluazinam, boscalida e azoxistrobina determinados no experimento anterior. Quando classificados para esses quatro fungicidas, foi possível verificar 11 fenótipos diferentes. Os 30 isolados selecionados abrangem todos os diferentes fenótipos dessa etapa (TABELA 6).

TABELA 6- FENÓTIPOS DOS ISOLADOS ESCOLHIDOS PARA ETAPA DA CE₅₀

FENÓTIPOS	ISOLADOS
P _R F _R B _R A _R	CM05 1
	PI01 3
P _R F _R B _S A _R	SJ4 9
	SJ8 5
P _R F _S B _R A _R	JP01 3
	L02 1
	MA01 2
P _R F _S B _S A _R	A02 1
	A06 3
	SJ06 4
	SJ07 1
	SJ19 5
P _S F _R B _R A _R	JB05 3
	JP07 1
	SJ18 6
	PI03 4
P _S F _R B _S A _R	CB01 1
	SJ22 4
P _S F _S B _R A _R	P02 1
	PB02 1
P _S F _S B _S A _R	JP01 5
	RA04 2
	RA08 1
	SJ13 2
	SJ15 4
	SJ38 5
P _S F _S B _S A _S	V02 1
	SJ45 1
P _R F _S B _S A _S	SJ31 6
P _S F _R B _S A _S	PI04 1

P.procimidona, F-fluazinam, B- boscalida, A- azoxistrobina, R- resistente e S- Sensível

3.3.3.1 Avaliação por crescimento micelial

O fungicida procimidona foi adicionado ao meio BDA para obtenção das concentrações 0; 1; 3; 5; 10; 50; 100 µg/ml. Discos de micélio contendo 5 mm de diâmetro de cada isolado foram transferidos para meio BDA contendo cada concentração. Os meios de cultura contendo os isolados foram incubados a 25°C sob fotoperíodo de 12 horas durante cinco dias. Após o cultivo foi avaliado o crescimento micelial por duas medições perpendiculares do diâmetro da colônia com auxílio de um paquímetro digital. A porcentagem de inibição do crescimento micelial (%ICM) foi calculada como descrito anteriormente. As concentrações dos fungicidas que inibem 50% do crescimento micelial foram estimadas para cada isolado por meio de regressões lineares entre os valores de %ICM e das concentrações de fungicida transformadas em \log_{10} .

3.3.3.2 Avaliação por germinação de conídios

Os ingredientes ativos foram adicionados ao meio AA para obtenção das concentrações 0, 1, 5, 10, 20, 50, 100 µg/ml para o fluazinam e azoxistrobina e as concentrações 0, 5, 10, 25, 50, 75, 100 µg/ml para boscalida. Para azoxistrobina o meio também foi acrescido de SHAM na concentração 100 µg/ml. A germinação de conídios foi estimada a partir da metodologia utilizada anteriormente. As concentrações dos fungicidas que inibem 50% da germinação de conídios foram estimadas para cada isolado através de regressões lineares entre os valores de %IGC e das concentrações de fungicida transformadas em \log_{10} .

3.3.4 Avaliação da eficácia de fungicidas no controle do mofo-cinza do morangueiro

Para avaliar a eficácia dos fungicidas no controle da doença, isolados de *B. cinerea* foram testados para azoxistrobina (Amistar 500 WG, Syngenta Proteção de

cultivos), tiofanato metílico (Cercobin 700 WP, Ihara), procimidona (Sumilex 500 WP, Sumitomo), boscalida (Cantus®, Basf Agri Production SA), fluazinam (Frownicide® 500 SC, ISK) e difenoconazol (Score 250 EC®, Syngenta Proteção de cultivos).

Morangos da cultivar Albion, sem resíduos de fungicidas, com maturação no ponto verde para vermelho foram utilizados para a condução do experimento. Os frutos foram desinfestados com hipoclorito de sódio 0,5% por 2 minutos. Em seguida foram enxaguados duas vezes em água destilada e secos em temperatura ambiente. Esses morangos foram submersos por 5 segundos em soluções fungicidas ajustadas nas concentrações recomendadas para o campo. As concentrações utilizadas foram 160 mg/L para azoxistrobina, 1000 mg/L para procimidona, 800 mg/L para Boscalida, 1000 µL/L para fluazinam, 700 mg/L para tiofanato metílico e 400 µL/L para difenoconazol. Frutos não tratados, mergulhados apenas em água destilada, foram utilizados no tratamento testemunha.

3.3.4.1 Eficácia em frutos com infecções vindas do campo

Um experimento foi conduzido seguindo o delineamento inteiramente casualizado, com 7 tratamentos e seis repetições. Cada repetição consistiu de três frutos. Frutos tratados conforme descrição acima foram colocados em potes plásticos e armazenados em a 22° C e fotoperíodo de 12 horas. A cada 12 h foi avaliada a incidência até o quinto dia após a inoculação (120h). Com os dados de incidência ao longo do tempo foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (SHANER & FINNEY, 1977), utilizando as médias das repetições de cada tratamento. A incidência final foi a incidência média das seis repetições a 120h. Também foram obtidos o período de incubação e o período de latência para cada repetição. Todos os dados foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) e foi feita a comparação de médias foi utilizado o teste de agrupamento de médias Scott Knott com 5% de probabilidade de erro.

3.3.4.2 Eficácia em frutos inoculados

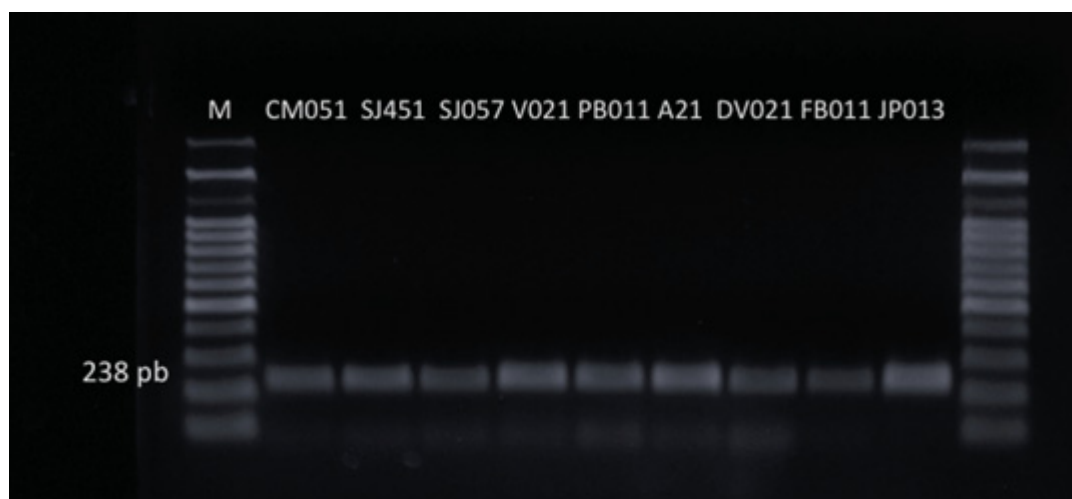
Foi conduzido um experimento em esquema fatorial (7x2) seguindo o delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições. Os fatores analisados foram fungicidas e isolados. Os fungicidas avaliados estão descritos no item 3.3.4. Um isolado com fenótipo resistente para todos os fungicidas testados (CM05 1) e um isolado com fenótipo sensível para todos os fungicidas (SJ05 7) foram utilizados para inoculação dos morangos. Cada repetição consistiu de três frutos. Os frutos sem ferimento receberam 50µl de suspensão de esporos contendo 10^5 esporos/mL e foram mantidos a 22°C com fotoperíodo de 12 horas. A cada 12 h foi avaliada a incidência até o quinto dia após a inoculação (120h). As análises dos dados foram realizadas iguais as descritas no item 3.3.4.1.

4 RESULTADOS

4.1 IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIE

O DNA dos 150 isolados permitiu a amplificação de um fragmento de 238 pares de bases (pb), como exemplificado pela FIGURA 1, e que corresponde a identificação de *B. cinerea*.

FIGURA 1 - IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE *Botrytis* spp. ORIUNDOS DAS DIFERENTES REGIÕES PRODUTORAS DO PARANÁ. AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DO GENE G3PDH.



M: Marcador molecular contendo 100 pb; CM05 1, SJ45 1, SJ05 7, V02 1, PB01 1, A2 1, DV02 1, FB01 1 E JP01 3: isolados de *Botrytis cinerea* (238 pb).

4.2 AVALIAÇÃO POR DOSE DISCRIMINATÓRIA

As doses discriminatórias permitiram distinguir diferentes padrões de sensibilidade dos isolados de *B. cinerea* aos fungicidas. Para os sete fungicidas utilizados nos ensaios de sensibilidade foi possível observar 41 fenótipos diferentes. Do total de 150 isolados, 141 apresentaram resistência a pelo menos dois fungicidas (FIGURA 2). Apenas dois isolados apresentaram sensibilidade para todos os fungicidas. Seis isolados mostraram resistência a todos os fungicidas. O fenótipo que

demonstrou maior frequência foi I_SP_RF_ST_RB_SA_R com 12 isolados. Para os fungicidas boscalida, iprodiona e procimidona, 45,3, 43,3, 44% de isolados foram resistentes, respectivamente (FIGURA 3). A porcentagem de isolados resistentes a azoxistrobina, fluzinam e difenoconazol foi de 90, 32,7 e 33,3%, respectivamente. Mais de 90% dos isolados foram altamente resistentes ao tiofanato metílico.

FIGURA 2 – NÚMERO DE ISOLADOS DE DIFERENTES FENÓTIPOS DE *Botrytis cinerea* ENCONTRADOS POR MEIO DE DOSE DISCRIMINATÓRIA. S- FENÓTIPO SENSÍVEL A TODOS OS FUNGICIDAS, T- TIOFANATO METÍLICO, A- AZOXISTROBINA, D- DIFENOCONAZOL, F- FLUAZINAM, B- BOSCALIDA, I- IPRODIONA, P- PROCIMIDONA, 0R- SEM RESISTENCIA AOS FUNGICIDAS, 1R- RESISTENTE A UM FUNGICIDA, 2R- RESISTENTE A DOIS FUNGICIDAS, 3R- RESISTENTE A TRÊS FUNGICIDAS, 4R- RESISTENTE A QUATRO FUNGICIDAS, 5R- RESISTENTE A CINCO FUNGICIDAS, 6R- RESISTENTE A SEIS FUNGICIDAS E 7R- RESISTENTE A SETE FUNGICIDAS.

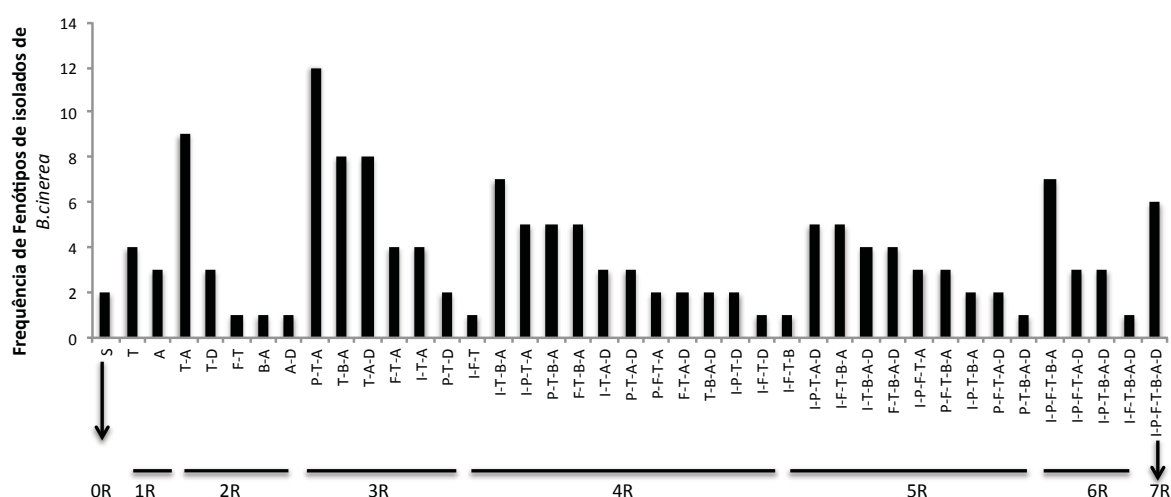
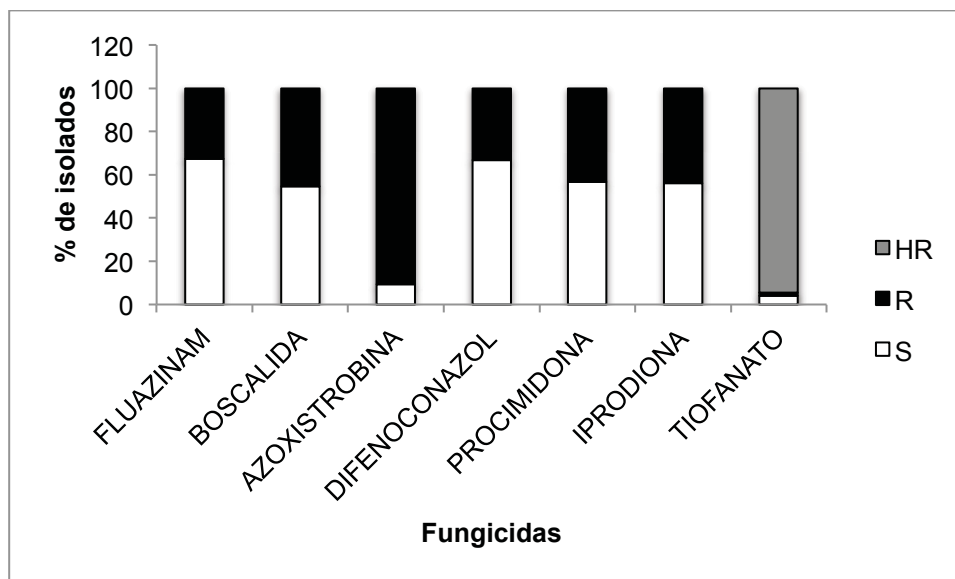


FIGURA 3 – CARACTERIZAÇÃO DE SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DE *Botrytis cinerea* PARA FLUAZINAM, BOSCALIDA, AZOXISTROBINA, DIFENOCONAZOL, PROCIMIDONA, IPRODIONA E TIOFANATO METÁLICO. FREQUÊNCIA DE ISOLADOS SENSÍVEIS (BRANCO), RESISTENTES (PRETO) E ALTAMENTE RESISTENTES (CINZA).



4.3 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO EFETIVA CAPAZ DE INIBIR 50% DO CRESCIMENTO MICELIAL OU DA GERMINAÇÃO DE ESPOROS (CE_{50})

Para 90% dos isolados, a CE_{50} para azoxistrobina foi superior a 100 $\mu\text{g/ml}$ (FIGURA 4A) e apenas três isolados, SJ45 1, SJ31 6 e PI04 1, apresentaram CE_{50} com valores abaixo de 6 $\mu\text{g/ml}$ (Tabela 7). Para os fungicidas procimidona, fluazinam e boscalida, os isolados foram bem heterogêneos. Cerca de 15% dos isolados apresentam CE_{50} superior a 100 $\mu\text{g/ml}$. Fluazinam, procimidona e boscalida tiveram 43, 30 e 36% de isolados com CE_{50} menor do que 1 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (FIGURA 4B, 4C e 4D). Os resultados obtidos na CE_{50} estão de acordo com os fenótipos estabelecidos na dose discriminatória (TABELA 7).

FIGURA 4 – FREQUÊNCIA DE DISTRIBUIÇÃO DE VALORES DE CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$) DE ISOLADOS DE *Botrytis cinerea* PARA PROCIMIDONA (A), FLUAZINAM (B), BOSCALIDA (C) E AZOXISTROBINA (D).

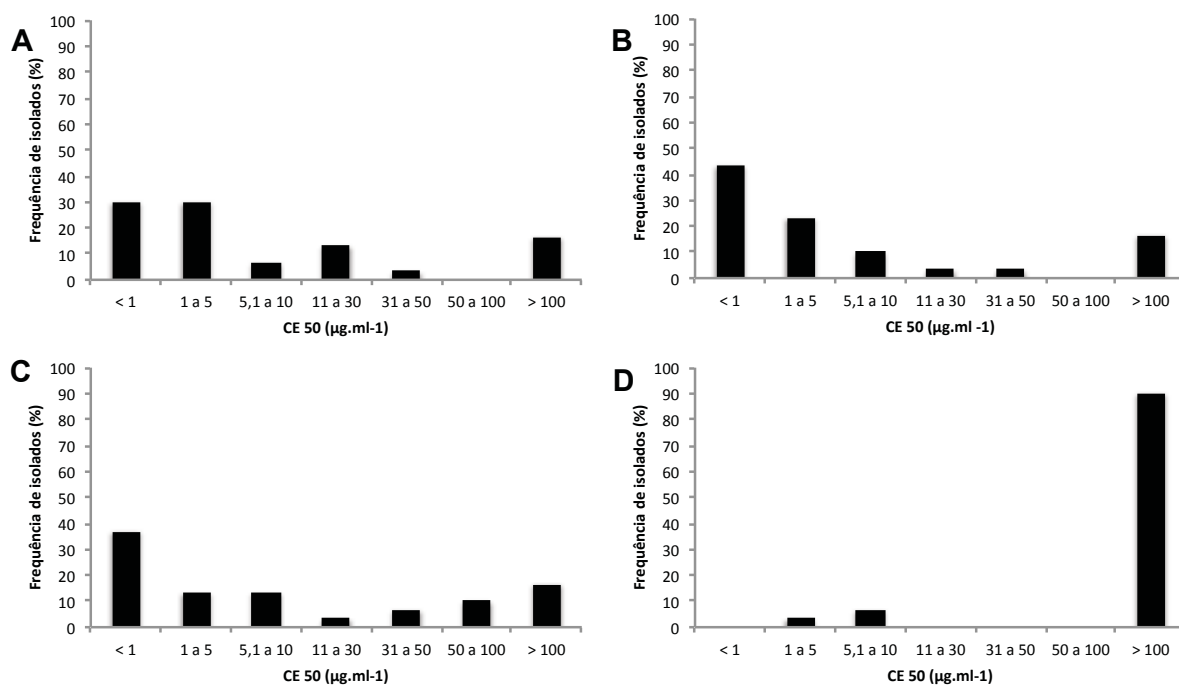


TABELA 7 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO EFETIVA (em µg/ml) DOS FUNGICIDAS PROCIMIDONA, FLUAZINAM, BOSCALIDA E AZOXISTROBINA PARA INIBIR 50% (CE₅₀) DO CRESCIMENTO DE ISOLADOS DE *Botrytis cinerea*.

Fenótipos	Isolados	CE ₅₀			
		Procimidona	Fluazinam	Boscalida	Azoxistrobina
P _R F _R B _R A _R	CM05 1	14,18	24,27	50,11	> 100
	PI01 3	34,88	7,56	> 100	> 100
P _R F _R B _S A _R	SJ4 9	13,63	> 100	5,55	> 100
	SJ8 5	> 100	2,81	1,07	> 100
P _R F _S B _R A _R	JP01 3	5,12	0,31	> 100	> 100
	L02 1	8,82	1,52	> 100	> 100
	MA01 2	> 100	2,33	61,44	> 100
P _R F _S B _S A _R	A02 1	24,77	0,41	0,01	> 100
	A06 3	> 100	1,12	0,01	> 100
	SJ06 4	16,3	0,55	0,71	> 100
	SJ07 1	> 100	< 0,1	0,32	> 100
	SJ19 5	> 100	1,56	0,47	> 100
P _S F _R B _R A _R	JB05 3	4,88	> 100	43,2	> 100
	JP07 1	< 0,12	36,44	77,95	> 100
	SJ18 6	2,26	> 100	48,12	> 100
	PI03 4	3,63	> 100	> 100	> 100
P _S F _R B _S A _R	CB01 1	0,55	5,76	0,1	> 100
	SJ22 4	4,42	> 100	7,09	> 100
P _S F _S B _R A _R	P02 1	0,89	1,12	26,2	> 100
	PB02 1	2,12	0,25	> 100	> 100
P _S F _S B _S A _R	JP01 5	1,77	0,05	0,25	> 100
	RA04 2	< 0,12	<0,1	0,1	> 100
	RA08 1	3,86	0,1	7,25	> 100
	SJ13 2	< 0,12	0,46	2,54	> 100
	SJ15 4	0,4	0,4	0,25	> 100
	SJ38 5	4,33	1,76	4,5	> 100
	V02 1	< 0,12	< 0,1	0,05	> 100
P _S F _S B _S A _S	SJ45 1	< 0,12	< 0,1	0,25	5,56
P _R F _S B _S A _S	SJ31 6	7,89	< 0,1	4,58	2,45
P _S F _R B _S A _S	PI04 1	1,67	5,77	6,77	4,78

P- Procimidona, F- Fluazinam, B- Boscalida, A- Azoxistrobina, S- Sensível e R- Resistente

4.4 AVALIAÇÃO DO ENSAIO COM FRUTOS

4.4.1 Eficácia em frutos com infecções vindas do campo

Os fungicidas fluazinam, boscalida e difenoconazol apresentaram melhor eficácia de controle devido a menores valores de incidência final e AACPD. Os fungicidas azoxistrobina e tiofanato metílico tiveram desempenho semelhante ao da testemunha (TABELA 8). O ensaio com frutos possibilitou a visualização do número de frutos doentes ao longo do tempo (FIGURA 5).

FIGURA 5 – NÚMERO DE FRUTOS DE MORANGO QUE APRESENTARAM SINTOMA DE MOFO CINZENTO EM MORANGO AO LONGO DO TEMPO EM FRUTOS COM INFECÇÕES VINDAS DO CAMPO.

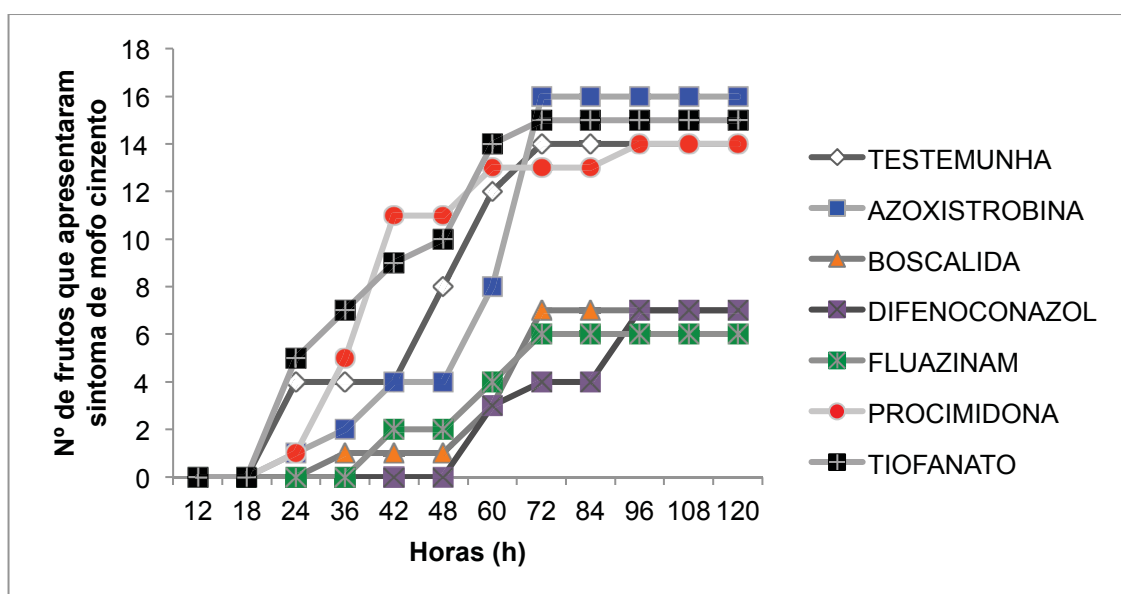


TABELA 8 – INCIDÊNCIA FINAL E ÁREA ABAIXO DA CURVA DE PROGRESSO DA DOENÇA COM INCIDÊNCIA DE FRUTOS DE MORANGO COM INFECÇÕES VINDAS DO CAMPO QUE APRESENTARAM SINTOMA DE MOFO CINZENTO.

TRATAMENTOS	INCIDÊNCIA	AACPD
Testemunha	77,78 a	6.149,91 a
Azoxistrobina	88,89 a	5.816,69 a
Boscalida	38,88 b	2.433,2 b
Difenoconazol	38,88 b	1.899,95 b
Fluazinam	33,33 b	2.233,31 b
Procimidona	55,56 a	6.150,1 a
Tiofanato Metílico	83,34 a	6.916,77 a

4.4.2 Eficiência em frutos inoculados em laboratório

Para o ensaio com frutos inoculados, não houve diferença de eficácia dos fungicidas para os isolados. O fungicida fluazinam foi o que melhor controlou a doença por apresentar menor incidência final e menor AACPD (TABELA 9 e 10). Os fungicidas difenoconazol, procimidona e boscalida apresentaram eficácia intermediária no controle da doença. Os fungicidas azoxistrobina e tiofanato metílico foram ineficazes no controle do mofo cinzento, mostrando não serem adequados para um tratamento pós-colheita (FIGURA 6; TABELAS 9 e 10).

FIGURA 6 - NÚMERO DE FRUTOS DE MORANGO INOCULADOS EM LABORATÓRIO QUE APRESENTARAM SINTOMA DE MOFO CINZENTO AO DECORRER DO TEMPO. **A-** ISOLADO CM05 1 E **B-** ISOLADO SJ05 7.

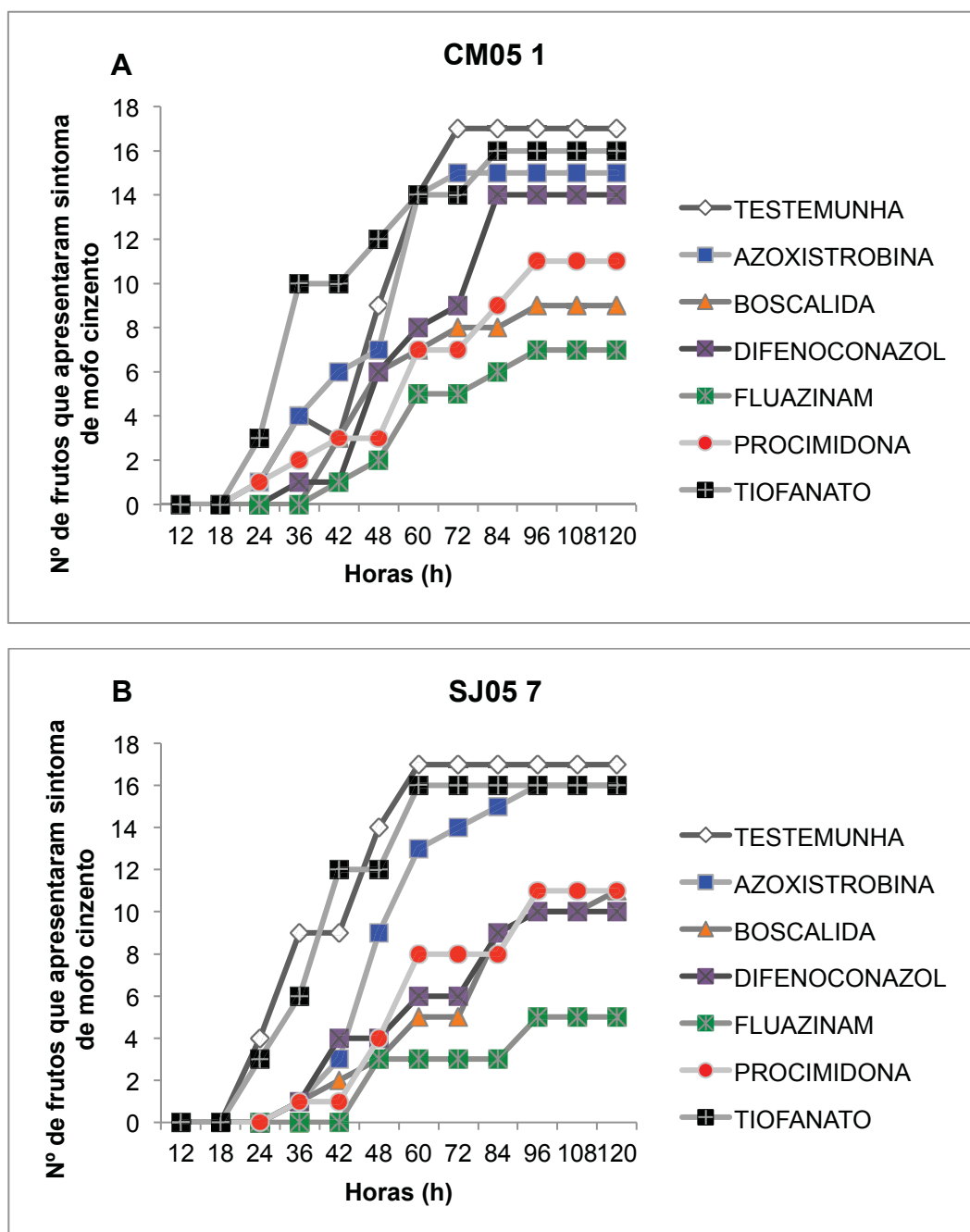


TABELA 9- INCIDÊNCIA FINAL DE FRUTOS DE MORANGO INOCULADOS EM LABORATÓRIO QUE APRESENTARAM SINTOMA DE MOFO CINZENTO APÓS 5 DIAS.

TRATAMENTOS	ISOLADOS		Média
	CM05 1	SJ05 7	
	(I _R P _R F _R T _R B _R A _R D _R)	(I _S P _S F _S T _S B _S A _S D _S)	
	INCIDÊNCIA		
Testemunha	94,45	94,45	94,45 a
Azoxistrobina	83,34	77,78	80,56 a
Boscalida	44,45	27,77	36,11 b
Difenoconazol	50	33,33	41,67 b
Fluazinam	27,78	16,67	22,22 c
Procimidona	38,88	44,45	41,66 b
Tiofanato Metílico	77,78	88,89	83,33 a
Média	59,52 ns	54,76 ns	

As médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. ns - não significativo.

TABELA 10- ÁREA ABAIXO DA CURVA DE PROGRESSO DA DOENÇA COM INCIDÊNCIA DE FRUTOS DE MORANGO INOCULADOS EM LABORATÓRIO QUE APRESENTAM SINTOMA DE MOFO CINZENTO.

TRATAMENTOS	ISOLADOS		Média
	CM05 1	SJ05 7	
	(I _R P _R F _R T _R B _R A _R D _R)	(I _S P _S F _S T _S B _S A _S D _S)	
	AACPD		
Testemunha	6.866,67	7.883,37	7.375,02 a
Azoxistrobina	5.500,06	6.166,64	5.833,35 a
Boscalida	3.433,38	3.233,29	3.333,33 b
Difenoconazol	4.783,39	3.449,91	4.116,65 b
Fluazinam	2.366,65	1.583,3	1.974,98 c
Procimidona	3.449,99	4.383,43	3.916,71 b
Tiofanato Metílico	7.183,44	7.316,71	7.250,07 a
Média	4.797,65 ns	4.859,52 ns	

As médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. ns - não significativo.

5 DISCUSSÃO

Todos isolados utilizados neste trabalho foram identificados como *B. cinerea*. Essa baixa variabilidade de espécies também foi relatada por Lopes (2016) que observou apenas *B. cinerea* em São Paulo, Minas Gerais e Espírito Santo. Entretanto, em outros países constataram que *B. fragariae* (RUPP et al., 2017), *B. caroliniana* (LI et al., 2012), *B. mali* (DOWLING & SCHNABEL, 2017) e *B. pseudocinerea* (PLESKEN et al., 2015) são capazes de causar mofo cinzento em morango. *Botrytis fragariae* foi isolado de tecidos mortos, múmias e principalmente flores, mas nunca de frutos apodrecidos (DOWLING et al., 2017). *Botrytis pseudocinerea* tem sido encontrada predominantemente em flores enquanto *B. cinerea* encontrado em frutos maduros (MICHAELIDES & XIAO, 2014). Como pode ser verificado na literatura internacional, *B. fragariae* e *B. pseudocinerea* são encontrados mais comumente em flores e não em frutos (RUPP et al., 2017). Tal fato corrobora com o presente trabalho que identificou somente *B. cinerea* em frutos e indica a necessidade de verificar sintoma e espécies que atacam flores no Paraná. Foram coletados apenas frutos sintomáticos devido a sua importância, principalmente na pós-colheita. Em flores os produtores da região relataram maiores problemas com *Colletotrichum acutatum* e não com *Botrytis*. *Botrytis caroliniana* é frequentemente relatado na Carolina do Sul em área produtora de morango e outras frutíferas, as quais podem servir como hospedeiro preferencial, a exemplo da amora (LI et al., 2012).

Em relação ao controle do mofo cinzento, os produtores de morango convencional no estado do Paraná usam com frequência procimidona, iprodiona, tiofanato metílico, azoxistrobina, boscalida e fluazinam. *Botrytis cinerea* é considerado um patógeno de alto risco para o desenvolvimento de resistência (FRAC, 2018). Assim já existem vários relatos de isolados de *B. cinerea* resistentes à fungicidas no mundo (FARETRA & POLLASTRO, 1991; LEROCH et al., 2013; LEROUX et al., 2002; LU et al., 2016; PETSİKOS-PANAYOTAROU et al., 2003; MOYANO et al., 2004; KOROLEV et al., 2011; LIU et al., 2016). Estudos indicam que a resistência

múltipla provavelmente acontece com seleções graduais, gerando um acúmulo de resistências (LI et al., 2014).

Neste estudo, isolados provenientes de campos orgânicos de morango foram resistentes ao tiofanato metílico e alguns mostraram resistência ao azoxistrobina. Como os isolados oriundos de área orgânica não foram expostos a fungicidas, isto indica que pode ter ocorrido contaminação cruzada e fluxo gênico com propriedades de cultivo convencional em razão da pequena distância entre elas. Resultados similares foram encontrados em isolados dos estados de São Paulo, Minas Gerais e Bahia (BAGGIO et al., 2018). Além disso, isolados resistentes a vários fungicidas podem se desenvolver em viveiros e posteriormente serem distribuídos aos produtores orgânicos e convencionais por meio de material de plantio (OLIVEIRA et al., 2017; LI et al., 2014).

Os fungicidas azoxistrobina, boscalida, fluazinam e procimidona foram escolhidos para determinação da CE_{50} . Dentre as dicarboxamidas foi selecionado o procimidona por ser o fungicida mais utilizado pelos produtores brasileiros. Não foi determinada a CE_{50} dos isolados para o tiofanato metílico e difenoconazol por apresentarem baixa sensibilidade em altas doses discriminatórias para esses fungicidas. 90% dos isolados do Paraná estão resistentes ao fungicida azoxistrobina, sendo que onde 27 dos 30 isolados apresentaram alta taxa de germinação de conídios a 100 µg/ml. Resistência de isolados de *B. cinerea* a azoxistrobina já foi reportada no Sudeste do Brasil (BAGGIO et al., 2018) e em países como Estados Unidos e Espanha (AMIRI et al., 2013; FERNANDEZ-ORTUÑO et al., 2016). Azoxistrobina não teve bom controle ao mofo cinzento, o fungicida obteve controle semelhante ao tratamento testemunha. Resultado semelhante foi encontrado em estudo com isolados do Sudeste do Brasil, onde todos os isolados cresceram em frutos tratados com azoxistrobina (BAGGIO et al., 2018). Azoxistrobina não é registrado para o controle de *B. cinerea*, entretanto, é registrado para o controle da Mancha de *Mycosphaerella* em morangueiro (AGROFIT, 2018). Dessa forma, ao se fazer aplicações para o controle de *Mycosphaerella*, o fungo pode ter contato com o fungicida. Caso o manejo seja inadequado o fungicida pode selecionar indivíduos resistentes na população de *Botrytis*. Nos EUA esse fungicida está registrado para o controle de *B. cinerea* e a dose recomendada é maior do que a permitida no Brasil. O que ocorre mais comumente quando é identificado um isolado com resistência é a conferência de mutação no gene alvo do fungicida, em que ocorre uma mutação

pontual no citocromo b (SIEROTZKI et al., 2000). Frequentemente isolados resistentes a azoxistrobina tem a mutação G143A no gene *cytb*. Esta mutação vem sendo associada à manifestação de resistência completa. Quando confirmada leva ao fracasso no controle da doença no campo (BANNO et al., 2009). A maioria dos isolados foram classificados em resistentes a azoxistrobina e em ensaios ex vivo foi verificada ineficácia do fungicida. Provavelmente muitos isolados do estado possam apresentar a mutação G143A. Essa mutação é extensamente documentada em isolados de vários patógenos de plantas fúngicas em todo o mundo, incluindo *B. cinerea* de morangos e outras frutas pequenas (AMIRI et al., 2013; BAGGIO et al., 2018).

Os isolados de *B. cinerea* foram insensíveis ao tiofanato metílico na concentração de 500 µg/ml, indicando que quase todos os isolados são altamente resistentes ao fungicida. O uso de fungicidas do grupo MBC foi liberado na década de 1960 no Brasil, e este fungicida é considerado de alto risco para o desenvolvimento de resistência dos patógenos (FRAC, 2017). Fato semelhante foi observado em outras regiões do Brasil, onde os isolados foram resistentes ao fungicida (BAGGIO et al., 2018; LOPES et al., 2017). O fungicida não proporcionou controle do mofo-cinzeno, indicando que não deve ser indicado no manejo da doença.

Menos de 50% dos isolados foram classificados como resistentes a iprodiona e procimidona. Essa frequência está abaixo dos valores já encontrados na China onde a frequência de isolados resistentes a procimidona foi de 53 e 85%, respectivamente (SUN et al., 2010; LIU et al., 2016). Apesar de ter sido observado isolados com alta CE₅₀ em laboratório, raramente são encontrados no campo, normalmente são encontrados isolados com baixos a moderados níveis de resistência no campo (GRABKE et al., 2014). Já é conhecido que isolados resistentes as dicarboxamidas podem apresentar uma menor competitividade em relação aos isolados sensíveis (ADNAN et al., 2018). A principal razão da resistência a dicarboxamidas é mutação no gene Bos1. Essas mutações pontuais no gene Bos1 já foram relatadas em vários países (MA et al., 2007).

Cerca de 45% dos isolados foram classificados como resistentes a boscalida. Esta alta frequência também já foi notada na Flórida (AMIRI et al., 2013), França, Alemanha (LEROUX et al., 2010), Califórnia (MERCIER et al., 2010) e Espanha (FERNANDEZ-ORTUÑO et al., 2017). Boscalida foi o primeiro fungicida do grupo dos ISDHs da “nova geração” a ser registrado no Brasil, em 2005, e até o momento, é o

único fungicida do grupo registrado para o controle do mofo cinzento (ADAPAR, 2018). A CE_{50} dos isolados ao Boscalida variou de 0,1 a valores superiores a 100 $\mu\text{g/ml}$. Em isolados considerados selvagens, que nunca entraram em contato com o fungicida, os valores da CE_{50} variaram de 0,03 a 0,1 $\mu\text{g/ml}$ na China (DE MICOLLIS et al., 2010).

O fungicida proporcionou bom controle de *Botrytis*, tanto *in vitro*, apresentando CE_{50} inferior a 1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ para a maioria dos isolados, quanto *ex vivo*, ao observar menor incidência final da doença. Resultados semelhantes foram observados na China, onde alguns isolados de *B. cinerea* não expostos ao fungicida anteriormente proporcionaram CE_{50} variando de 0,0018 a 0,049 $\mu\text{g/ml}$ (SHAO, 2015). Da mesma forma seis isolados do Paraná obtiveram CE_{50} inferior a 0,1 $\mu\text{g/ml}$. A resistência de campo de *B. cinerea* ao fluazinam só foi observada no Japão em feijão (TAMURA, 2000). Com base na classificação FRAC, fluazinam é considerado de baixo risco para o desenvolvimento de resistência do patógeno, o que é confirmado com um bom desempenho no controle do mofo cinzento. Os isolados que se mostraram resistentes à fluazinam, muitas vezes podem não ser encontrados com frequência no campo, pois seu mecanismo de resistência é controlado por um mecanismo de ação análogo ao das dicarboxamidas (OSHIMA et al., 2002; KANETIS et al., 2006). Assim isolados sensíveis ao fluazinam se mostram mais tolerantes ao estresse osmótico do que os isolados resistentes (SHAO et al., 2015). Apesar dos bons resultados produtos comerciais a base de fluazinam são registrados apenas para a cultura e não para o controle no mofo cinzento no Brasil (AFROFIT, 2018).

Botrytis cinerea permanece frequentemente quiescente por tempo considerável antes de apodrecer tecidos quando a fisiologia do hospedeiro muda e o ambiente é propício (WILLIAMSON et al., 2007). Os maiores danos podem ocorrer após a colheita de frutos aparentemente saudáveis. Produtos colhidos podem ser deteriorados na cadeia de varejo, durante o armazenamento, transporte para mercados distantes ou durante a exibição no varejista (DEAN et al., 2012). O ensaio com frutos sem inoculação mostrou alta frequência de frutos que inicialmente eram sadios e em alguns dias aparecem com sintoma da doença. O fungicida difenoconazol mostrou capacidade de retardar o aparecimento da doença em 30 horas em relação a testemunha. O que é de extrema importância, uma vez que a comercialização de morangos é rápida. Então poucos dias de atraso no aparecimento

da doença já pode ser satisfatório. Além disso o período de carência desse fungicida é de apenas dois dias (AGROFIT, 2018).

Considerando que grande parte dos isolados apresentou resistência múltipla aos sete fungicidas mais utilizados no estado e que o número de ingredientes ativos registrado para a cultura é reduzido, tudo indica que o futuro cenário do manejo de *B. cinerea* é preocupante e indefinido. Decorrente disso, o controle do mofo cinzento e de outras doenças de difícil manejo na cultura pode ser alcançado por meio do manejo integrado de doenças. Por outro lado, a alta sensibilidade da população de *B. cinerea* do Paraná ao fluazinam e a sua boa eficácia no controle da doença indica que o fungicida é uma boa alternativa para ser utilizada no manejo da doença. Portanto, há a necessidade de registrá-lo para *B. cinerea* na cultura do morango. E como tiofanato metílico vem apresentando ineficácia no controle da doença, sua recomendação para a cultura deve ser suspensa.

O início das aplicações dos fungicidas talvez possa ser revisto, pois para muitos fungicidas recomenda-se o início das aplicações após a formação dos primeiros frutos mas muitas vezes a infecção do patógeno ocorre na abertura das flores, para isso é importante mais estudos na flor e investigar quando ocorrem essas infecções latentes no campo. Já que vem mostrando ser o principal problema para a comercialização do morango.

6 CONCLUSÕES

- Todos os isolados foram identificados como *Botrytis cinerea*;
- Os isolados apresentaram diferentes fenótipos de resistência;
- Foram observados isolados sensíveis e resistentes a todos os fungicidas;
- Fluazinam, apesar de não registrado para *B. cinerea* em morango, é o fungicida mais eficiente para o manejo do mofo-cinza, enquanto azoxistrobina e tiofanato metílico são os menos eficientes.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo foi possível analisar o panorama geral de como estão os isolados de *B. cinerea* do estado do Paraná em relação a sensibilidade aos fungicidas mais utilizados. Ainda não se tinha estudos a respeito da sensibilidade de isolados do estado. Foi possível observar que muitos isolados já possuem resistência múltipla, o que é preocupante para o futuro do manejo da cultura.

O estudo também mostrou uma informação da eficácia dos principais fungicidas em diferentes isolados. Assim foi possível notar uma ineficiência dos fungicidas tiofanato metílico e azoxistrobina. E boa eficiência do fungicida fluazinam no controle de *Botrytis*.

São necessários estudos futuros quanto a eficiência dos fungicidas à campo realizando aplicações na floração, na formação de frutos e em ambos, mostrando a situação real de campo. Também é necessário o estudo de competitividade e adaptabilidade de isolados resistentes e sensíveis. Como já se sabe para alguns fungicidas os isolados resistentes podem não ser tão competitivos quanto os sensíveis. Outra possibilidade que esse estudo deixa em aberto é estudar o uso de outros métodos de controle no manejo de *B. cinerea*. Principalmente se for detectado competitividade de isolados resistente com isolados sensíveis. É necessário realizar o estudo de possíveis mutações em isolados resistentes aos fungicidas. Em coletas futuras isolar também flores com o intuito de investigar a existência de outras espécies de *Botrytis* causando mofo cinzento em morango no estado.

E como este foi o primeiro estudo dessa categoria realizado no estado foi escolhido fazer uma amostragem de todo o estado, englobando as principais regiões produtoras. Porém para estudos futuros será interessante realizar monitoramento da resistência em poucas propriedades.

REFERÊNCIAS

- ADNAN, M.; HAMADA, M.S.; LI, G. Q.; LUO, C. X. Detection and molecular characterization of resistance to the dicarboximide and benzamide fungicides in *Botrytis cinerea* from tomato in Hubei Province, China. **Plant Disease**. 2018.
- AGROFIT – SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS. 2018. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 15 de Janeiro 2019.
- ALMEIDA, I. R. DE et al. Zoneamento Agroclimático para produção de morango no Rio Grande do Sul. Embrapa Clima Temperado, **Documentos**, v. 283, 28 p. 2009.
- AMIRI, A.; ONOFRE, R. B.; PERES, N. A. First report of gray mold caused by *Botryotinia ricin* (*Amphobotrys ricini*) on strawberry in United States. **Plant Disease**. v.100, p.1007. 2016.
- AMIRI, A.; HEATH, S. M.; PERES, N. A. Phenotypic characterization of multifungicide resistance in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry fields in Florida. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 97, n. 3, p. 393–401, 2013.
- AMIRI, A.; HEATH, S. M.; PERES, N. A. Resistance to fluopyram, fluxapyroxad, and penthiopyrad in *Botrytis cinerea* from strawberry. **Plant Disease**. v. 98. 532-539. 2014.
- AMSELEM, J.; CUOMO, C. A.; VAN KAN, J.; VIAUD, M.; BENITO, E. P.; COULOUX, A. Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. **PLoS Genet** 2010.
- AVENOT, H. F.; SELLAM, A.; KARAOGLANIDIS, G.; MICHAILIDES, T. J. Characterization of mutations in the iron-sulphur subunit of succinate dehydrogenase correlating with boscalid resistance in *Alternaria alternata* from California pistachio. **Phytopathology**. v. 98, 736–42. 2008.
- BAGGIO, J. S. Sensibilidade a fungicidas e dinâmicas espacial e temporal de *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum* spp. em campos de morangueiro convencionais e orgânicos. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo (USP). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ. Piracicaba. 2016.

BAGGIO, J. S.; PERES, N. A.; AMORIM, L. Sensitivity of *Botrytis cinerea* isolates from conventional and organic strawberry fields in Brazil to Azoxystrobin, Iprodione, Pyrimethanil, and Thiophanate-methyl. *Plant Dis.* v. 102 n. 9. P.1803-1810, 2018.

BARTLETT, D. W.; CLOUGH, J. M.; GODWIN, J. R.; HALL, A. A.; HAMER, M.; PARR-DOBRZANSKI, B. The strobilurin fungicides. **Pest Manag. Sci.** v.58, 649–662. 2002.

BERRIE, A. M.; HARRIS, D. C.; XU, X. M. A potential system for managing *Botrytis* and powdery mildew in main season strawberries. **Acta Hort.** V.567, 647–649. 2002.

BEVEER, R. E.; BRIEN, H. M. R. A survey of resistance to the dicarboximide fungicides in *Botrytis cinerea*. **New Zealand Journal of Agricultural Research.** 37-41. 2015.

BOTTON, et al. Sistema de produção de morango para mesa na região da Serra Gaúcha e encosta superior do Nordeste. 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/MesaSerraGaucha/plastica.htm>>. Acesso em: 5 junho 2017.

BRAUN, P. G.; SUTTON, J. C. Inoculum sources of *Botrytis cinerea* in fruit rot of strawberries in Ontario. *Can. J. Plant Pathol.* v.9, 1-5. 1987.

BRISTOW, P. R.; MCNICOL, R. J.; WILLIAMSON, B. Infection of strawberry flowers by *Botrytis cinerea* and its relevance to grey mould development. **Ann. Appl. Biol.** V.109, 545-554. 1986.

BRENT, K. J.; HOLLOMON, D. W. **Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed?** Brussels: Global Crop Protection Federation. 2007.

CAMARGO, L. K. et al. Postharvest quality of strawberry fruits produced in organic and conventional systems. **Horticultura Brasileira**, v. 29, p. 577–583, 2011.

CARROLL, J.; PRITTS, M.; HEIDENREICH, C. **Organic Production and IPM Guide for Strawberries.** New York State Integrated Pest Management Program. Ithaca, N.Y. 64p. 2015.

CHILVERS, M. I. Detection and identification of *Botrytis* species associated with neck rot, scape blight, and umbel blight of Onion. **Plant Health Prog.** 113. 2007.

COCCO, C. **Qualidade Fisiológica das Mudanças na Produção de Frutos do Morangueiro.** 48 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia Universidade Federal de Santa Maria), Centro de Ciências Rurais, Santa Maria, 2010.

COLE, L.; DEWEY, F. M.; HAWES, C. R. Infection mechanisms of *Botrytis* species: pre-penetration and pre-infection processes of dry and wet conidia. **Mycol. Res.** v.100, 277–286. 1996.

COSTA, H.; MAY DE MIO, L. L.; RUARO, L.; MOREIRA, L. M; VENTURA, J. A. Como produzir Morangos. IN: M. A. C. Zawadneak, J. M. Schuber and A. F. Mógor (Eds.), Manejo integrado de doenças do morangueiro. Curitiba: Editora da UFPR. p. 193-215. 2014.

DEAN, R.; KAN, L. V.; PRETORIUS, Z. A.; HAMOND-KOSACK, K. E.; DI PIETRO, A.; SPANU, P. D., RUDD, J. J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J.; FOSTER, G. D. The Top 10 fungals pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology.** V.13, 414-430. 2012.

DEKKER, J. Resistance. IN: Marsh R. W. ed., **Systemic fungicides.** London, Longman. p. 176-197. 1977.

DE MICCOLIS ANGELINI, R. M.; HABIB, W.; ROTOLO, C.; POLLASTRO, S.; FARETRA, F. Selection, characterization and genetic analysis of laboratory mutants of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) resistant to the fungicide boscalid. **Eur. J. Plant Pathol.** v.128, 185-199. 2010.

DE WAARD, M. A., VAN NISTELROOY, J. G. M., Stepwise development of laboratory resistance to DMI-fungicides in *Penicillium italicum*. **Neth. J. Pl. Pathol.**, 96. 1990.

DOMINGUES, R.J; TÕFOLI, J.G; PINTO, R.F. Sensibilidade “in vitro” a iprodiona, taxa de crescimento e patogenicidade de linhagens de *Botrytis cinerea* à Rosa sp. **Ecossistema**, Espírito Santo do Pinhal, v.28, n. 1, p.35-39, 2003.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11-15, 1987.

DOWLING, M. E., SCHNABEL, G. First report of *Botrytis mali* causing gray mold on strawberry in the United States. **Plant Dis.** v. 101, 1034. 2017.

DROBY, S.; LICHTER, A. Post-harvest *Botrytis* infection: etiology, development and management. In: ELAD, Y.; WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, P.; DELEN, N. (Ed.). **Botrytis: biology, pathology and control**. Dordrecht: Springer. p. 349–367. 2007.

FARETRA, F.; POLLASTRO, S.; Genetic basis of resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicide in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). **Mycol. Res.** 95, 943-951. 1991.

FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D.; TORÉS, J. A.; CHAMORRO, M.; PÉREZ-GARCÍA, A.; VICENTE, A. Characterization of resistance to six chemical classes of site-specific fungicides registered for gray mold control on strawberries in Spain. **Plant Disease**, Saint Paul, 2016.

FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D.; GRABKE, A.; LI, X.; SCHNABEL, G. Independent emergence of resistance to seven chemical classes of fungicides in *Botrytis cinerea*. **Phytopathology** 105:424-567 432. 2015.

FERNANDEZ-ORTUÑO, D.; GRABKE, A.; BRYSON, P. K.; AMIRI, A.; PERES, N. A.; SCHNABEL, G. Fungicide resistance profiles in *Botrytis cinerea* from strawberry fields of seven southern U.S. states. **Plant Disease**, 98, 825-833. 2014.

FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D.; SCHNABEL, G. First report of thiophanate-methyl resistance in *B. cinerea* on strawberry from South Carolina. **Phytopathology** 96:1700. 2012.

FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D.; CHEN, F.; SCHNABEL, G. Resistance to pyraclostrobin and boscalid in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry fields in the Carolinas. **Plant Disease**. 96:1198–1203. 2012.

FILLINGER, S.; ELAD, Y. *Botrytis* – the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems. **Springer**. 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **FaoStat**. Production of crops: Strawberries. 2019. Disponível em: <<http://www.fao.org/traditional-crops/finger millet/en/>>. Acesso em: 27 jan. 2019.

FOURNIER, E.; GIRAUD, T.; ALBERTINI, C.; BRYGOO, Y. Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies. **Mycologia**. 97:1251–1267. 2005.

FRAC code list 2018: fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering). 2018. Disponível em: <<http://www.frac.info/docs/defaultsource/publications/frac-code-list/frac-code-list-2017-finalC2AD7AA36764.pdf>>. Acesso em : Janeiro 2018.

GIMENEZ, G; ANDRIOLO, J; GODOI, R. Cultivo sem solo do morangueiro. **Ciência Rural**. 38: 273-279. IAL - Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo: Ed. Digital. 2008.

GIRAUD, T.; FORTINI, D.; LEVIS, C.; LAMARQUE, C.; LEROUX, P.; LOBUGLIO, Y.; BRYGOO, Y. Two sibling species of the *Botrytis cinerea* complex, *transposa* and *vacuma*, are found in sympatry on numerous host plants. **J Phytopathol** 89:967–973. 1999.

GRABKE, A.; FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D.; AMIRI, A.; LI, X.; PERES, N. A.; SMITH, P.; SCHNABEL, G. Characterization of iprodione resistance in *Botrytis cinerea* from strawberry and blackberry. **Phytopathology** 104:396-402. 2014.

GUO, Z. J.; MIYOSHI, H.; KOMYOJI, T.; HAGA, T.; FUJITA, T. Uncoupling activity of a newly developed fungicide, fluazinam [3-chloro-N-(3-chloro-2,6-dinitro-4-trifluoromethylphenyl)-5-trifluoromethyl-2-pyridinamine]. **Biochim Biophys Acta**. 1056:89–92. 1991.

HANCOCK, J. F.; SOC, T. T.; D. H.; LAWRENEC, F. J. Strawberries. In: JANI KC, J.; MOORE, J. N. (Eds.) **Fruit breeding: vine and small fruits crops**. p.419-470. 1996.

HENZ, G. P. Desafios enfrentados por agricultores familiares na produção de morango no Distrito Federal. **Hortic. Bras.** Brasília, v. 28, n. 3, p. 260-265, Sept. 2010.

HU, M. J.; DOWLING, M. E.; SCHNABEL, G. Genotypic and phenotypic variations in *Botrytis spp.* isolates from single strawberry flowers. **Plant disease**. v. 102, n. 1 p. 179-184, 2018.

INOUE, K.; TSURUMI, T.; ISHII, H.; PARK, P.; IKEDA, K. Cytological evaluation of the effect of azoxystrobin and alternative oxidase inhibitors in *Botrytis cinerea*. **FEMS Microbiol.** v. 326. p. 83-90. 2012.

ISHII, H.; MIYAMOTO, T.; USHIO, S.; KAKISHIMA, M. Lack of cross-resistance to a novel succinate dehydrogenase inhibitor, fluopyram, in highly boscalid-resistant isolates of *Corynespora cassiicola* and *Podosphaera xanthii*. **Pest Manag Sci** 67:474–482. 2011.

KANETIS, L.; FÖRSTER, H.; JONES, C. A.; BORKOVICH, K. A.; ADASKAVEG, J. E. Characterization of genetic and biochemical mechanisms of fludioxonil and pyrimethanil resistance in field isolates of *Penicillium digitatum*. **Phytopathology** 98:205–214. 2008.

KOIKE, S.T.; GORDON, T.; AJWA, H.; DAUGOVISH, O.; BOLDA, M.; LEGARD, D. Disease Management Studies on Strawberry Plant Collapse Problems in California. **California Strawberry Commission Annual Production Research Report.** pp. 41–51. 2010.

KOROLEV, N.; MAMIEV, M.; ZAHAVI, T.; ELAD, Y.; Screening of *Botrytis cinerea* isolates from vineyards in Israel for resistance to fungicides. **Eur. J. Plant Pathol.** 129, 591-608. 2011.

KOVACH, J.; PETZOLDT, R.; HARMAN, G. E. Use of honey bees and bumble bees to disseminate *Trichoderma harzianum* 1295-22 to strawberries for Botrytis control. **Biol. Control.** 18, 235–242. 2000.

LEGARD, D. E.; XIAO, C. L.; MERTELY, J. C.; CHANDLER, C. K. Effects of plant spacing and cultivar on incidence of *Botrytis* fruit rot in annual strawberry. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n. 5, p. 531–538, 2000.

LEROUX, P.; GREDET, M.; LEROCH, M.; WALKER, A. S. Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. **Appl. Environ. Microbiol.** 76:6615- 6630. 2010.

LEROUX, P.; FRITZ, R.; DEBIEU, D.; ALBERTINI, C.; LANEN, C.; BACH, J., et al. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. **Pest Management Science**, 58(9), 876–888. 2002.

LI, X.; FERNANDEZ-ORTUÑO, D.; GRABKE, A.; LUO, C. X.; SCHNABEL, G. Location-Specific Fungicide Resistance Profiles and Evidence for Stepwise

Accumulation of Resistance in *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**. V. 98. 1066- 1074. 2014.

LI, X., KERRIGAN, J., CHAI, W., SCHNABEL, G. *Botrytis caroliniana*, a new species isolated from blackberry in South Carolina. **Mycologia** 104, 650-658. 2012.

LIU, S.; CHE, Z.; CHEN, G. Multiple-fungicide resistance to carbendazim diethofencarb, procymidone, and pyrimethanil in field isolates of *Botrytis cinerea* from tomato in Henan Province, China. **Crop Prot.** 84:56-61. 2016.

LOPES, U. P.; ZAMBOLIM, L.; CAPOBIANGO, N. P.; GRACIA, N. A. O.; FREITAS-LOPES, R. L. Resistance of *Botrytis cinerea* to fungicides controlling gray mold on strawberry in Brazil. **Bragantia**. v.76 n. 2, p. 266-272. 2017.

LOPES, U. P. **Podridão pós-colheita em morango: Etiologia e efeito de produtos alternativos**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 55p. 2011.

LEROCH, M.; PLESKEN, C.; WEBER, R. W. S.; KAUFF, F.; SCALLIET, G.; HAHN, M. Gray mold populations in German strawberry fields are resistant to multiple fungicides and dominated by a novel clade closely related to *Botrytis cinerea*. **Applied and Environmental Microbiology**, 79(1), 159–167. 2013.

LU, X. H.; JIAO, X. L.; HAO, J. J.; CHEN, A. J.; GAO, W. W. Characterization of resistance to multiple fungicides in *Botrytis cinerea* populations from asian ginseng in northeastern China. **Eur J Plant Pathol**. V. 144. 467-476. 2016.

MA, Z.; MICHAILIDES, T. J. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, Guildford, v. 24, n. 10, p. 853–863, 2005.

MA, Z.; YAN, L.; LUO, Y.; MICHAILIDES, T. J. Sequence variation in the two-component histidine kinase gene of *Botrytis cinerea* associated with resistance to dicarboximide fungicides. **Pestic. Biochem. Physiol.** 88:300-306. 2007.

MADAIL., J. C. M. et al. **Avaliação Econômica dos Sistemas de Produção de Morango: Convencional, Integrado e Orgânico**. Comunicado Técnico 181. P. 4. 2007.

MADALI, J. C. M.; ANTUNES, L. E. C.; JUNIOR, C. R.; BELARMINO, L. C.; NEUTZLING, D. M.; SILVA, B. A. Economia da produção de morango: Estudo de caso de transição para produção integrada. Pelotas: **Embrapa Clima Temperado**. 24p. 2007.

MALANDRAKIS, A.; MARKOGLU, A.; ZIOGAS, B. Molecular characterization of benzimidazole-resistant *B. cinerea* field isolates with reduced or enhanced sensitivity to zoxamide and diethofencarb. **Pestic. Biochem. Physiol.** 99:118-124. 2011

MERCIER, J.; KONG, M.; COOK, J. Fungicide resistance among *Botrytis cinerea* isolates from California strawberry fields. **Plant Health Progress**. Online publication. doi:10.1097/PHP-210-0806-01-RS. 2010.

MERTELY, J. C.; LEGARD, D. E. Detection, isolation, and pathogenicity of *Colletotrichum* spp. from strawberry petioles. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, p. 407–412, 2004.

MOYANO, C.; GOMEZ, V.; MELGAREJO, P., Resistance to Pyrimethanil and other fungicides in *Botrytis cinerea* populations collected on vegetable crops in Spain. **J. Phytopathol.** 152, 484-490. 2004.

MUELLER, D. S.; BRADLEY, C. A.; NIELSEN, J. **Field crop fungicides for the north central United States**. Agricultural Experiment Station, Iowa State University. 24–25. 2008.

OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B.; FINKENAUER, D. Produção de morangueiro da cv. Camino Real em sistema de túnel. **Revista Brasileira de Fruticultura** 30: 681-684. 2008.

OSHIMA, M.; FUJIMURA, M.; BANNO, S.; HASHIMOTO, C.; MOTOYAMA, T.; ICHIISHI, A. et al. A point mutation in the two component histidine kinase BcOS-1 gene confers dicarboximide resistance in field isolates of *Botrytis cinerea*. **Phytopathology**, 92(1), 75–80. 2002.

PETSIKOS-PANAYOTAROU, N.; MARKELLOU, E.; KALAMARAKIS, A. E.; KYRIAKOPOULOU, D.; MALATHRAKIS, N. E. *In vitro* and *in vivo* activity of cyprodinil and pyrimethanil on *Botrytis cinerea* isolates resistant to other botryticides and selection for resistance to pyrimethanil in a greenhouse population in Greece. **Eur. J. Plant Pathol.** 109, 173-182. 2003.

PERES, N.; MACKENZIE, S. Colletotrichum Crown Rot (Anthracnose Crown Rot) of Strawberries. pp. 238, **Plant Pathology** 3p. 2013.

PLESKEN, C.; WEBER, R. W. S.; RUPP, S.; LEROCH, M.; HAHN, M. *Botrytis pseudocinerea* is a significant pathogen of several crop plants but susceptible to displacement by fungicide resistant *B. cinerea* strains. **Appl. Environ. Microbiol.** 81:7048-7056. 2015.

PORTELA, I. P.; PEIL, R. M. N.; ROMBALDI, C. V. Efeito da concentração de nutrientes no crescimento, produtividade e qualidade de morangos em hidroponia. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 266- 273, 2012.

RUPP, S.; PLESKEN, C.; RUMSEY, S.; DOWLING, M.; SCHNABEL, G.; WEBER, R. W. S., et al. *Botrytis fragariae*, a new species causing gray mold on strawberries, shows high frequencies of specific and efflux-based fungicide resistance. **Appl. Environ. Microbiol.** 2017.

RUPRECHT, J.; YANKOVSKAYA, V.; MAKLASHINA, E.; IWATA, S.; CECCHINI, G. Structure of Escherichia coli succinate:quinone oxidoreductase with an occupied and empty quinone-binding site. **J. Biol. Chem.** V. 284, 29836-29846. 2009.

SEAB DERAL- Secretaria da Agricultura e do Abastecimento- SEAB Departamento de Economia Rural- DERAL. **Fruticultura Paraná**. Estado do Paraná. 2016.

SHANER, G. & R.E. FINNEY. The effect of nitrogen fertilisation on the expression of slow mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology** 67: 1051–1056. 1977.

SIEROTZKI, H.; PARISI, S.; STEINFELD, U.; TENZER, I.; POIREY, S.; GISI, U. Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome bc1 complex of *Mycosphaerella fijiensis*. **Pest Manag Sci** 56: 833–841. 2000.

SIMON, N.; MENEGUZZO, A.; CALGARO, A. Doenças causadas por fungos e bactérias IN: SANHUEZA, R. M. V. et al. **Sistema de produção de morango para mesa na região da serra gaúcha e encosta superior do Nordeste**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. 2007.

SHAO, H.; WEICHAO, R.; YU, Z.; YIPING, H.; YABING, D.; JIANXIN, W.; MINGGUO Z.; CHANGJUN, C. Baseline sensitivity of natural populations and characterization of resistant strains of *Botrytis cinerea* to fluazinam. **Australasian Plant Pathol.** 44, 375–383. 2015.

STAMMLER, G.; REHFUS, A.; PROCHNOW, J.; BRYSON, R.; STROBEL, D. New findings on the development of insensitive isolates of *Pyrenophora teres* towards SDHI fungicides. **Julius-Kühn-Archiv**. 447, 568. 2014.

STAMMLER, G.; SPEAKMAN, J. Microtiter method to test the sensitivity of *Botrytis cinerea* to boscalid. **J. Phytopathol.** 154:508-510. 2006.

STEHMANN, C.; WAARD, M. A. Factors influencing activity of triazole fungicides towards *Botrytis cinerea*. **Crop Protection**. V. 15, 39-47. 1996.

SUN, H. Y.; WANG, H. C.; CHEN, Y.; LI, H. X.; CHEN, C. J.; ZHOU, M. G. Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from vegetable crops to carbendazim, diethofencarb, procymidone, and pyrimethanil in China. **Plant Disease**, 94(5), 551–556. 2010.

SUTTON, J. C. Epidemiology and management of *Botrytis* leaf blight of onion and gray mold of strawberry: A comparative analysis. **Can. J. Plant Pathol.** 12:100-110. 1990.

TAMURA, O. **Resistance development of gray mold on beans towards Fluazinam and relevant countermeasures**. Abstracts of 10th Symposium of Research Committee of Fungicide Resistance. Okayama Japan 7–16. 2000.

VILLANI, S. M.; AYER, K.; COX, K. D. Molecular characterization of the *sdhB* gene and baseline sensitivity to penthiopyrad, fluopyram, and benzovindiflupyr in *Venturia inaequalis*. **Plant Dis.** 100: 1709-1716. 2016.

VIRET, O.; KELLER, M.; JAUDZEMS, V. G.; COLE, M. F. *Botrytis cinerea* infection of grape flowers: light and electron microscopical studies of infection sites. **Phytopathology**, 94, 850–857. 2004.

VITALE, A.; PANEBIANCO, A.; POLIZZI, G. Baseline sensitivity and efficacy of fluopyram against *Botrytis cinerea* from table grape in Italy. **Ann. Appl. Biol.** 2016.

YANG, J. H.; BRANNEN, P. M.; SCHNABEL, G. Resistance in *Alternaria alternata* to SDHI fungicides causes rare disease outbreak in peach orchards. **Plant Dis.** 99:65-70. 2015.

YIN, D.; CHEN, X.; HAMADA, M. S.; YU, M.; YIN, Y.; MA, Z. Multiple resistance to Qols and other classes of fungicides in *Botrytis cinerea* populations from strawberry in Zhejiang province, China. **Eur J Plant Pathol.** 141:169–177. 2015.

WILCOX, W. F.; SEEM, R. C. Relationship between strawberry gray mold incidence, environmental variables, and fungicide applications during different periods of the fruiting season. **Phytopathology** 84:264-270. 1994.

WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, B.; TUDZYNSKI, P.; VAN KAN, J. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 8, n. 5, p. 561–580, 2007

XIAO, C. L.; CHANDLER, C. K.; PRICE, J. F.; DUVAL, J. R.; MERTELY, J. C.; LEGARD, D. E. Comparison of epidemics of *Botrytis* fruit rot and powdery mildew of strawberry in large plastic tunnel and field production systems. **Plant Dis.** 85, 901–909. 2001.

ZHANG, C. Q.; YUAN, K.; SUN, H. Y.; QI, Z. Q.; ZHOUNAND, M. G. ZHU, G. N. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from vegetable greenhouses to Boscalid. **Plant Pathology.** 56, 646–653. 2007

ZHAO, H.; KIM, Y. K.; HUANG, L.; XIAO, C. L. Resistance to thiabendazole and baseline sensitivity to fludioxonil and pyrimethanil in *Botrytis cinerea* populations from apple and pear in Washington State. **Postharvest Biology and Technology**, v. 56, p. 12–18.

APÊNDICE – TABELA COMPLETA DE FENÓTIPOS

ISOLADO	IPRODIONA 5PPM			PROCIMIDONA 5 PPM			FLUAZINAM10 PPM			TIOFANATO			BOSCALIDA 50 PPM			AZOXISTROBINA 10 PPM			DIFENOCON10 PPM			TIPO
	ICM	FENOTIPO		ICM	FENOTIPO		ICM	FENOTIPO		FENOTIPO		ICG	FENOTIPO		ICG	FENOTIPO		ICM	FENOTIPO			
A01 2	100,00	S		100,00	S		100,00	S		HR		100,00	S		100,00	S		94,93	S		PS	
A01 8	100,00	S		100,00	S		100,00	S		HR		78,00	R		16,00	R		76,31	R		PS	
A02 1	40,00	R		30,00	R		97,17	S		HR		100,00	S		18,67	S		67,32	R		PF	
A02 8	100,00	S		100,00	S		100,00	S		HR		94,00	S		52,67	S		73,12	R		PS	
A03 3	54,30	R		83,09	S		92,33	S		HR		66,67	R		24,67	R		100,00	S		PS	
A06 3	95,56	S		0,00	R		96,00	S		HR		100,00	S		14,00	R		95,61	S		PF	
A07 5	13,43	R		47,78	R		100,00	S		HR		100	S		14,00	R		30,32	R		PF	
A10 3	100,00	S		41,97	R		100,00	S		HR		100,00	S		40,00	R		45,88	R		PF	
A11 2	100,00	S		35,64	R		97,98	S		HR		100,00	S		53,00	R		100,00	S		PF	
A11 3	2,55	R		100,00	S		100,00	S		HR		100	S		53,00	R		100	S		PS	
A13 3	95,04	S		33,96	R		100,00	S		HR		94,00	S		24,65	R		78,57	R		PF	
A14 4	96,91	S		46,53	R		100,00	S		HR		100,00	S		53,33	R		93,25	S		PF	
A14 5	81,50	S		100,00	S		98,67	S		HR		100,00	S		28,57	R		70,94	R		PS	
CB01 1	100,00	S		100,00	S		4,38	R		HR		100,00	S		14,97	R		100,00	S		PS	
CM01 1	70,78	R		74,97	R		100,00	S		HR		100,00	S		40,00	R		79,75	R		PF	
CM02 1	72,14	R		41,53	R		100,00	S		HR		100,00	S		34,67	R		100,00	S		PF	
CM02 5	100,00	S		100,00	S		100,00	S		HR		98,00	S		59,00	R		67,07	R		PS	
CM03 1	100,00	S		92,75	S		100,00	S		HR		16,00	R		10,00	R		100,00	S		PS	
CM03 2	77,20	R		0,00	R		18,00	R		HR		53,68	R		30,53	R		71,89	R		PF	
CM04 2	76,00	R		0,23	R		100,00	S		HR		100,00	S		40,00	R		100,00	S		PF	
CM05 1	82,53	S		31,63	R		1,33	R		HR		30,00	R		42,00	R		77,28	R		PF	
CM05 2	76,57	R		79,96	R		6,67	R		HR		32,00	R		44,00	R		80,98	S		PF	
DV02 1	100,00	S		100,00	S		100,00	S		S		0,00	R		36,67	R		100,00	S		PS	
FB01 1	100,00	S		76,30	R		100,00	S		HR		58,00	R		4,67	R		100,00	S		PF	

JB01 1	59,21	R	85,99	S	100,00	S	HR	100,00	S	30,00	R	100,00	S	PS
JB01 4	81,63	S	82,17	S	16,67	R	HR	47,12	R	21,32	R	76,52	R	PS
JB02 1	68,60	R	61,28	R	3,33	R	HR	100,00	S	22,92	R	100,00	S	PF
JB02 2	54,84	R	88,22	S	100,00	S	R	8,07	R	17,89	R	44,56	R	PS
JB03 2	23,32	R	80,60	S	6,67	R	HR	54,21	R	30,64	R	100,00	S	PS
JB04 4	12,99	R	77,20	R	2,00	R	HR	77,78	R	51,39	R	72,06	R	PF
JB05 1	100,00	S	86,22	S	4,00	R	HR	65,55	R	30,98	R	70,67	R	PS
JB05 3	59,14	R	84,24	S	3,70	R	HR	57,33	R	32,67	R	66,44	R	PS
JB06 3	38,20	R	83,55	S	32,66	R	R	0,00	R	30,00	R	100,00	S	PS
JB07 2	34,73	R	87,60	S	1,33	R	HR	100,00	S	27,89	R	100,00	S	PS
JB07 4	56,64	R	63,59	R	10,00	R	HR	34,55	R	23,34	R	100,00	S	PF
JB08 4	76,43	R	60,24	R	34,67	R	HR	100,00	S	16,67	R	100,00	S	PF
JB08 5	6,83	R	73,85	R	12,00	R	HR	100,00	S	24,00	R	72,55	R	PF
JB09 2	100,00	S	100,00	S	4,67	R	HR	44,00	R	33,33	R	100,00	S	PS
JB09 4	100,00	S	19,31	R	7,67	R	HR	100,00	S	30,53	R	52,47	R	PF
JB10 2	84,97	S	85,88	S	2,20	R	HR	100,00	S	23,61	R	100,00	S	PS
JP01 3	70,52	R	77,34	R	100,00	S	HR	22,34	R	0,00	R	55,39	R	PF
JP01 5	100,00	S	100,00	S	100,00	S	HR	100,00	S	22,00	R	100,00	S	PS
JP02 5	31,67	R	77,14	R	4,08	R	HR	100,00	S	43,33	R	100,00	S	PF
JP07 3	100,00	S	100,00	S	0,00	R	HR	18,00	R	63,33	R	90,83	S	PS
JP04 1	100,00	S	100,00	S	100,00	S	HR	18,00	R	24,00	R	100,00	S	PS
JP06 3	59,11	R	55,46	R	1,75	R	HR	0,00	R	6,67	R	65,00	R	PF
JP07 1	100,00	S	100,00	S	0,00	R	HR	36,14	R	14,39	R	63,91	R	PS
JP08 1	73,11	R	80,99	S	1,72	R	HR	40,14	R	38,10	R	100,00	S	PS
JP08 2	73,66	R	68,02	R	6,00	R	HR	4,67	R	3,33	R	100,00	S	PF
JP09 3	68,38	R	0,00	R	0,00	R	HR	45,00	R	48,00	R	100,00	S	PF
JP09 5	81,52	S	45,20	R	100,00	S	HR	48,67	R	62,00	R	100,00	S	PF
L02 1	98,24	S	42,04	R	62,00	S	HR	0,00	R	40,82	R	100,00	S	PF
MA011	86,95	S	100,00	S	100,00	S	HR	57,33	R	16,67	R	100,00	S	PS

MA01 2	72.42	R	35.68	R	100.00	S	HR	40.00	R	12.00	R	74.74	R	PF
MA02 1	100.00	S	89.47	S	100.00	S	HR	0.00	R	26.67	R	100.00	S	PS
P02 1	100.00	S	100.00	S	100.00	S	HR	65.00	R	17.33	R	70.31	R	PS
PB01 1	70.68	R	68.51	R	100.00	S	HR	44.34	R	28.76	R	100.00	S	PF
PB02 1	66.00	R	87.80	S	100.00	S	HR	51.33	R	24.67	R	100.00	S	PS
PB02 2	72.77	R	38.71	R	100.00	S	HR	32.67	R	14.00	R	100.00	S	PF
PI01 3	82.08	S	36.14	R	14.67	R	HR	5.00	R	12.67	R	86.31	S	PF
PI01 4	24.40	R	79.79	R	16.00	R	HR	31.33	R	17.33	R	100.00	S	PF
PI02 4	0.37	R	33.92	R	9.09	R	HR	14.67	R	0.00	R	75.64	R	PF
PI03 4	69.34	R	95.75	S	0.67	R	HR	6.00	R	4.00	R	100.00	S	PS
PI04 1	50.43	R	100.00	S	13.80	R	HR	100.00	S	94.00	S	100.00	S	PS
PI04 4	84.00	S	100.00	S	25.25	R	HR	100.00	S	93.33	S	100.00	S	PS
PI05 4	12.31	R	100.00	S	100.00	S	HR	6.00	R	3.00	R	63.61	R	PS
PI06 2	100.00	S	100.00	S	2.67	R	HR	6.12	R	3.40	R	100.00	S	PS
PI07 4	28.48	R	57.47	R	8.42	R	HR	20.00	R	50.00	R	55.58	R	PF
PI08 1	0.00	R	7.32	R	12.67	R	HR	14.67	R	56.00	R	48.00	R	PF
PI08 4	73.34	R	64.10	R	100.00	S	HR	20.00	R	56.00	R	64.69	R	PF
RA01 1	100.00	S	78.77	R	98.00	S	HR	48.67	R	7.33	R	84.77	S	PF
RA02 1	89.15	S	42.21	R	100.00	S	HR	54.00	R	14.00	R	49.86	R	PF
RA02 2	100.00	S	100.00	S	100.00	S	HR	60.87	R	36.00	R	100.00	S	PS
RA03 1	100.00	S	90.07	S	100.00	S	HR	43.54	R	20.41	R	100.00	S	PS
RA03 2	100.00	S	81.94	S	5.05	R	HR	12.00	R	11.33	R	75.08	R	PS
RA04 1	100.00	S	100.00	S	100.00	S	S	92.00	S	35.00	R	100.00	S	PS
RA04 2	100.00	S	100.00	S	100.00	S	S	81.75	S	24.21	R	100.00	S	PS
RA05 1	100.00	S	71.17	R	100.00	S	HR	0.00	R	14.00	R	100.00	S	PF
RA06 1	100.00	S	92.21	S	100.00	S	HR	100.00	S	0.00	R	100.00	S	PS
RA07 1	100.00	S	100.00	S	100.00	S	HR	100.00	S	99.65	S	53.00	R	PS
RA08 1	72.18	R	100.00	S	97.33	S	HR	100.00	S	0.00	R	41.88	R	PS
SJ02 1	100.00	S	5.24	R	100.00	S	HR	100	S	67.72	R	100.00	S	PF

SJ04 9	70.30	R	36.30	R	6.00	R	HR	100.00	S	60.00	R	79	R	PF
SJ05 7	92.46	S	100.00	S	100.00	S	S	100	S	96.56	S	88.94	S	PS
SJ05 8	100.00	S	100.00	S	100.00	S	HR	100.00	S	46.00	R	61.2	R	PS
SJ06 4	86.69	S	0.00	R	100.00	S	HR	100.00	S	66.67	R	73.33	R	PF
SJ06 5	48.49	R	88.34	S	79.33	S	HR	91.33	S	57.33	R	76.53	R	PS
SJ07 1	27.89	R	11.50	S	100.00	S	HR	100.00	S	2.00	R	77.79	R	PS
SJ07 5	74.13	R	38.22	R	100.00	S	HR	100.00	S	33.33	R	100.00	S	PF
SJ08 5	67.03	R	15.97	R	35.33	R	HR	100.00	S	30.00	R	70.21	R	PF
SJ08 8	100.00	S	73.15	R	55.33	S	HR	100.00	S	18.67	R	78.21	R	PF
SJ09 4	89.86	S	17.78	R	4.00	R	HR	48.00	R	33.33	R	90.40	S	PF
SJ10 3	100.00	S	0.00	R	100.00	S	HR	100.00	S	47.67	R	82.37	S	PF
SJ11 5	69.97	R	13.69	R	88.00	S	HR	100.00	S	93.27	S	76.45	R	PF
SJ11 9	78.62	R	0.00	R	95.00	S	HR	100.00	S	45.00	R	75.72	R	PF
SJ12 1	100.00	S	100.00	S	100.00	S	HR	100.00	S	0.00	R	87.89	S	PS
SJ12 3	89.90	S	100.00	S	100.00	S	HR	100.00	S	47.00	R	66.31	R	PS
SJ13 2	100.00	S	100.00	S	99.33	S	HR	100.00	S	50.00	R	78.75	R	PS
SJ13 2	100.00	S	100.00	S	100.00	S	HR	100.00	S	32.00	R	73.38	R	PS
SJ14 5	70.02	R	2.07	R	98.67	S	HR	100.00	S	63.00	R	65.30	R	PF
SJ14 9	100.00	S	0.00	R	100.00	S	HR	100.00	S	62.67	R	100.00	S	PF
SJ15 4	100.00	S	100.00	S	100.00	S	HR	81.33	S	16.67	R	100.00	S	PS
SJ15 9	100.00	S	100.00	S	100.00	S	HR	93.22	S	33.11	R	100.00	S	PS
SJ16 5	86.73	S	0.00	R	6.00	R	HR	100.00	S	45.33	R	100.00	S	PF
SJ16 7	45.00	R	29.94	R	52.67	S	HR	100.00	S	45.00	R	100.00	S	PF
SJ17 5	85.18	S	91.22	S	100.00	S	HR	100.00	S	28.33	R	100.00	S	PS
SJ17 6	93.00	S	5.32	R	84.00	S	HR	100.00	S	28.00	R	100.00	S	PF
SJ18 6	100.00	S	90.49	S	2.67	R	HR	54.39	R	17.19	R	100.00	S	PS
SJ19 5	100.00	S	18.40	R	100.00	S	HR	100.00	S	36.67	R	100.00	S	PF
SJ20 2	100.00	S	100.00	S	40.67	R	HR	100.00	S	0.00	R	92.20	S	PS
SJ20 4	100.00	S	100.00	S	100.00	S	HR	100.00	S	78.67	R	69.81	R	PS

SJ21 9	100,00	S	0,00	R	10,67	R	HR	87,33	S	23,67	R	100,00	S	PF
SJ22 1	100,00	S	84,16	S	9,67	R	HR	100,00	S	20,00	R	73,26	R	PS
SJ22 4	100,00	S	88,32	S	2,00	R	HR	85,00	S	8,00	R	83,58	S	PS
SJ23 1	82,00	S	78,77	R	95,33	S	HR	56,52	R	14,49	R	85,48	S	PF
SJ23 4	16,19	R	83,68	S	100,00	S	HR	57,19	R	41,75	R	100,00	S	PS
SJ24 5	96,61	S	68,43	R	100,00	S	HR	85,00	S	87,00	S	71,7	R	PF
SJ24 6	93,27	S	100,00	S	20,00	R	HR	91,33	S	14,67	R	73,51	R	PS
SJ25 1	100,00	S	100,00	S	100,00	S	HR	100,00	S	27,00	R	100,00	S	PS
SJ25 5	100,00	S	69,79	R	100,00	S	HR	100,00	S	27,33	R	100,00	S	PF
SJ26 1	64,85	R	39,89	R	18,37	R	HR	80,67	S	16,67	R	100,00	S	PF
SJ26 4	93,67	S	18,11	R	100,00	S	HR	100,00	S	26,56	R	100,00	S	PF
SJ27 8	100,00	S	47,86	R	100,00	S	HR	100,00	S	28,76	R	81,56	S	PF
SJ28	100,00	S	100,00	S	100,00	S	HR	87,00	S	90,00	S	75,77	R	PS
SJ28 2	100,00	S	100,00	S	100,00	S	S	100,00	S	30,00	R	73,35	R	PS
SJ28 3	100,00	S	100,00	S	100,00	S	HR	95,67	S	91,33	S	70,93	R	PS
SJ29	73,73	R	63,45	R	100,00	S	HR	98,00	S	30,00	R	94,67	S	PF
SJ29 2	100,00	S	100,00	S	97,94	S	HR	99,33	S	25,33	R	87,89	S	PS
SJ30 3	76,53	R	85,86	S	84,14	S	HR	32,36	R	45,78	R	80,51	S	PS
SJ30 4	100,00	S	100,00	S	100,00	S	S	100	S	100,00	S	100,00	S	PS
SJ31 5	74,52	R	65,69	R	100,00	S	HR	100,00	S	48,00	R	20,00	R	PF
SJ31 6	98,03	S	60,09	R	100,00	S	HR	100	S	100,00	S	76,09	R	PF
SJ32 8	19,57	R	80,68	S	100,00	S	HR	48,00	R	36,00	R	100,00	S	PS
SJ331	81,73	R	100,00	S	14,67	R	HR	44,22	R	39,46	R	90,09	S	PS
SJ35 2	100,00	S	100,00	S	100,00	S	HR	100,00	S	35,00	R	100,00	S	PS
SJ36 4	48,72	R	81,15	S	19,53	R	HR	49,33	R	36,00	R	100,00	S	PS
SJ36 5	78,70	R	86,82	S	100,00	S	HR	36,00	R	45,00	R	57,42	R	PS
SJ37 4	42,03	R	83,88	S	100,00	S	HR	30,00	R	42,00	R	100,00	S	PS
SJ38 5	75,81	R	81,05	S	100,00	S	HR	100,00	S	70,00	R	100,00	S	PS
SJ39 1	32,35	R	83,20	S	100,00	S	HR	20,67	R	54,00	R	76,18	R	PS

SJ40 3	100,00	S	100,00	S	HR	0,00	R	76,00	R	100,00	S	PS
SJ40 4	87,44	S	82,79	S	HR	0,00	R	76,00	R	100,00	S	PS
SJ42 3	18,78	R	18,52	R	HR	20,00	R	54,00	R	100,00	S	PF
SJ43 4	70,88	R	100,00	S	HR	46,00	R	28,00	R	100	S	PS
SJ43 7	100,00	S	100,00	S	HR	42,00	R	40,00	R	100,00	S	PS
SJ44 3	100,00	S	100,00	S	HR	100,00	S	100,00	S	89,61	S	PS
SJ45 1	100,00	S	100,00	S	HR	100,00	S	93,00	S	100,00	S	PS
SJ45 5	100,00	S	100,00	S	HR	100,00	S	98,00	S	100,00	S	PS
SJ46 3	100,00	S	30,88	R	HR	100,00	S	28,67	R	100,00	S	PF
V02 1	100,00	S	100,00	S	HR	100,00	S	66,00	R	100,00	S	PS